Einfluß von Phosphat und Ruthenium Rot auf das Calcium bei Rattenlebermitochondrien

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Günter Blaich

aus Oberkollwangen

1984

UNIV.
LONDON
LIBR.

Einfluß von Phosphat und Ruthenium Rot auf das Calcium bei Rattenlebermitochondrien

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Günter Blaich

aus Oberkollwangen

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 2. 1984

Dekan: Prof. Dr. Joachim Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Erich Pfaff
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Albrecht Wendel

Abstract

Blaich, Günter

Einfluß von Phosphat und Ruthenium Rot auf das Calcium bei Rattenlebermitochondrien

Phosphat steigert bei Mitochondrien die Aufnahme von Calcium bei mäßig hohen Calciumkonzentrationen und verhindert die Abgabe bei hohem pH. Bei niedrigem pH dagegen beschleunigt Phosphat die Calciumabgabe. Diese setzt verzögert ein, wobei Zeitpunkt und Geschwindigkeit von der Calciumkonzentration abhängen. Mit der Calciumabgabe sind Schwellung der Mitochondrien und Zerstörung der Permeabilitätsschranke für Saccharose und Chlorid verbunden. Magnesium verhindert die Calciumabgabe und die damit verbundenen destruktiven Prozesse. Ruthenium Rot (RR) und EGTA schützen die Mitochondrien vor der mit ihrer Zerstörung einhergehenden Calciumabgabe, führen aber zu einer langsamen und stetigen Abgabe von Calcium und Phosphat. Sie bleiben ohne Schutzwirkung auf die Mitochondrien, sobald spontane Calciumabgabe eingesetzt hat. Die destruktive Calciumabgabe ist abhängig vom Zeitraum, in dem atmungsgehemmte Mitochondrien in Gegenwart von Calcium vorinkubiert werden, ehe Calciumaufnahme nach Succinatgabe erfolgt. Phosphat und mitochondriale Energetisierung wirken dem Auftreten der destruktiven Calciumeffekte entgegen.

Die Calciumabgabe nach Ruthenium Rot zeigt, abhängig vom Zeitpunkt der Zugabe, einen biphasischen Verlauf; die Abgabe erfolgt demnach aus zwei unterschiedlichen Pools. Ohne Vorinkubation findet man nur eine Abgabe aus einem Pool (intakte Mitochondrien), während mit zunehmender Vorinkubation der andere schnellere Pool ständig zunimmt (geschädigte Mitochondrien). Die Zerstörung der Mitochondrien durch Phosphat und damit irreversibler Calciumabgabe kann durch rechtzeitige Gabe von Ruthenium Rot verhindert werden.

Unsere Versuche zeigen, daß selbst in Gegenwart des permeablen Anions Acetat das mitochondriale Calcium osmotisch inaktiv vorliegt. Osmotische Aktivität des Calciums unter diesen Bedingungen schien bislang gesichert und wurde als Beweis für die Aufnahme des Calciums nach dem Membranpotential angenommen. Außerdem läßt die von uns gezeigte differenzierte Wirkung des Ruthenium Rots auf den Efflux die Anschauung eines völlig unabhängigen Abgabeweges nicht zu. Damit sind aber die Grundanschauungen über die Regulation der mitochondrialen Calciumverteilung über unabhängige Influx- und Effluxwege in Frage gestellt und neu zu überdenken.

UNIV. LAIDEN BIBL.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

- Krell, H., Täfler, M., Blaich, G., Pfaff, E. (1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 59-71

- Blaich, G., Krell, H., Täfler, M., Pfaff, E. (1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 73-82

Die vorliegende Dissertation wurde von Oktober 1981 bis Dezember 1983 am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H. Remmer) unter Anleitung von Prof. Dr. E. Pfaff durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. E. Pfaff danke ich für das außerordentliche Interesse an meiner Arbeit, der ständigen Diskussionsbereitschaft und der mir jederzeit erwiesenen großzügigen Förderung, sowie für die vielen guten Ratschläge.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. H. Krell für sein Interesse und die Hinführung in die komplexe Welt der Mitochondrien.

Frau S. Kasperek und Herrn G. Joachim danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der technischen Durchführung meiner Untersuchungen, Herrn W. Schneck für die sorgfältige Betreuung meiner Versuchstiere.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Jäschke für das Interesse an meiner Arbeit und die ausgezeichnete Zusammenarbeit in den letzten Jahren, sowie Herrn Prof. Dr. A. Wendel für seine Tips und Hilfeleistungen.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Meinen Eltern

Abkürzungen

Acac	Acetoacetat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CCP	m-Chlor-Carbonylcyanid-Phenylhydrazon
EGTA	Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (reduziert)
P_i	Orthophosphat
RR	Ruthenium Rot
Succ	Tris-Succinat
TCA	Trichloressigsäure
TRAP	Triäthanolamin-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Val	Valinomycin
$\Delta\psi$	Membranpotential
Δ_p	proton motive force
$\Delta\mu_{H^+}$	elektrochemisches Potential von Protonen über die Mitochondrienmembran

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Aufnahme und Abgabe von Calcium bei Mitochondrien	2
1.1.1.	Einfluß von Phosphat auf Calciumbewegungen über die Mitochondrienmembran	4
1.1.2.	Zur Frage einer unabhängigen Calciumabgabe; Untersuchungen mit Ruthenium Rot	7
1.2.	Der Aktivitätskoeffizient von Calcium im Mitochondrium	9
1.3.	Mitochondriales Calciumcycling und seine physiologische Bedeutung	11
2.	ZIEL DER ARBEIT	13
3.	MATERIALIEN UND METHODEN	14
3.1.	Materialien	14
3.1.1.	Versuchstiere	14
3.1.2.	Chemikalien	14
3.1.3.	Radiochemikalien	14
3.1.4.	Medien	15
3.1.5.	Geräte	15
3.2.	Methoden	16
3.2.1.	Isolation der Mitochondrien	16
3.2.2.	Qualitätskontrolle	17
3.2.3.	Proteinbestimmung	17
3.2.4.	Versuchsdurchführung	18
3.2.4.1.	Inkubation der Mitochondrien	18
3.2.4.2.	Silikonzentrifugation	19
3.2.4.3.	Probenaufarbeitung	19
3.2.4.4.	Radioaktivitätszählung	20

4. ERGEBNISSE 23

4.1. Calciumabgabe nach Phosphat 23

4.1.1. Energetische Parameter, Volumina und Ionenbewegungen nach Phosphat 23

4.1.2. Antagonistische Wirkung von Phosphat auf die Calciumabgabe in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration 26

4.1.3. Einfluß von Phosphat auf die Calciumaufnahme 27

4.1.4. Gegenläufige Wirkung von Phosphat in Abhängigkeit vom pH 28

4.1.5. Vielfältige Einflüsse von Phosphat und Calcium auf die destruktive Calciumabgabe 33

4.1.6. Inhibierung der Calciumabgabe nach Phosphat durch Ruthenium Rot und Magnesium 35

4.2. Einfluß von Ruthenium Rot auf die Calciumabgabe nach Phosphat 37

4.2.1. Biphasische Calciumabgabe nach Ruthenium Rot 37

4.2.2. Calciumabgabe und Schwellung von Mitochondrien in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit 41

4.2.3. Schnelle Abgabe von Calcium nach Ruthenium Rot 44

4.2.4. Langsame Calciumabgabe nach Ruthenium Rot 45

4.2.5. Inhibierung der Phosphat-induzierten Calciumabgabe und Schwellung durch Ruthenium Rot 46

4.3. Calciumaufnahme bei Mitochondrien: Wird Calcium wirklich osmotisch aktiv aufgenommen ? 49

5. DISKUSSION 53

5.1. Die Calciumabgabe nach Phosphat 53

5.1.1. Einfluß von Phosphat, Acetoacetat und pH auf die Calcium-abhängige Calciumabgabe 53

5.1.2. Calcium-induzierte Veränderungen an der Mitochondrienmembran 54

5.2. Die Calciumabgabe nach Ruthenium Rot-Gabe 57

5.3. Zur Frage der osmotischen Aufnahme von Calcium 61

6. Literatur 65

Lebenslauf 71

1. EINLEITUNG

Die Bedeutung der Calciumkonzentration bei der Steuerung des zellulären Stoffwechsels ist heute ein wesentlicher Bestandteil wissenschaftlicher Erkenntnis. Die Zelle kann auf ihre vielfältigen Regulationsaufgaben nur reagieren, wenn sie über einen intrazellulären Feinsteuerungsmechanismus der Calciumkonzentration verfügt. Neben dem Protein Calmodulin sind vor allem die Plasmamembran und die Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien an der Feinregulation der Ionengradienten beteiligt. Das Zusammenspiel der Einzelkomponenten wird aber für keine Zelle voll verstanden, obwohl sich abzeichnet, daß sie in den einzelnen Zelltypen durchaus unterschiedliches Gewicht haben können. Dieses umfassende Verständnis wird besonders schwierig bei Mitochondrien, bei denen Abgabe und Aufnahme von Calcium über die Membran in ihren funktionellen Konsequenzen unklar ist. An diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an, um am Modell der isolierten Lebermitochondrien weitere Erkenntnisse zur Regulation der Calciumbewegungen an Mitochondrienmembranen beizutragen.

Der aktuelle Stand der Forschung [34] wird heute aus seinem historischen Kontext heraus folgendermaßen verstanden: Isolierte Mitochondrien können in Gegenwart von Calcium maximal atmungsstimuliert werden und dabei bis zu 1 000 nMol Calcium/mg Protein aufnehmen unter gleichzeitigem Absenken der extramitochondrialen Calciumkonzentration auf unter 1 µM. Solche Bedingungen des "massive loading" mit millimolaren Konzentrationen an angebotenem Calcium wurden tatsächlich angewandt [1], vorwiegend jedoch nur in den frühesten Untersuchungen, da hier spezielle Bedingungen zur Stabilisierung der Mitochondrien notwendig waren [2]. Die Mehrzahl späterer Untersuchungen zur Calciumaufnahme und ihrer Beziehung zur chemiosmotischen Theorie wurde bei anfänglichen Calciumkonzentrationen von 10^{-4}M im Medium durchgeführt, wobei eine mitochondriale Beladung von 50 - 500 nMol Calcium/mg Protein erreicht wurde [3 - 5]. Neuerdings wurden Mitochon-

drien in "limited loading" Studien 10 - 100 nMol Calcium/mg Protein ausgesetzt, wobei sich das Interesse auf unabhängige Calciumabgabewege konzentrierte. Es wurde versucht, durch Charakterisierung der Aufnahme und Abgabe eine Vorstellung über die steady-state Regulation von extramitochondrialem Calcium zu gewinnen [6]. Schließlich erwachte auch Interesse für die Regulation des intramitochondrialen Calciums; hier arbeitete man mit Calciumgehalten von 2 - 20 nMol/mg Protein und externen Konzentrationen kleiner als 10^{-7}M [7].

1.1. Aufnahme und Abgabe von Calcium bei Mitochondrien

Über Calcium an isolierten Mitochondrien existiert eine immense Primärliteratur, die inzwischen in vielen Übersichtsartikeln zusammengefaßt wurde und von denen hier nur einige wesentliche zitiert seien [3,5,6,8-10]. Allen gemeinsam ist die Annahme, daß Aufnahme und Abgabe von Calcium über unterschiedliche Wege verlaufen, wenn Bedingungen eingehalten werden, die den mutmaßlich niedrigen zytoplasmatischen Calciumaußenkonzentrationen entsprechen.

Der Mechanismus der Calciumaufnahme wird in einem direkten Zusammenhang mit dem Prozeß der Energietransduktion und damit der oxidativen Phosphorylierung gesehen. Bei der allgemein akzeptierten chemiosmotischen Theorie der oxidativen Phosphorylierung geht man davon aus, daß die freiwerdende Energie bei der Übertragung von Elektronen von NADH auf Sauerstoff in der Elektronentransportkette zu einem elektrogenen Efflux von Protonen aus der Matrix ins Cytosol führt [11,12]. Damit kommt es zur Ausbildung eines Protonen-elektrochemischen Gradienten ($\Delta\mu_{H^+}$) mit einem elektrischen Anteil (Membranpotential $\Delta\psi$, innen negativ) und dem Protonenkonzentrationsgradienten (ΔpH, innen alkalisch). Die Calciumaufnahme verläuft über einen elektrophoretischen Uniport-Mechanismus, welcher Calcium über die Membran bewegt ohne direkte Kopplung mit der Bewegung anderer Ionen. Die Nettoeinwärtsbewegung von positiven Ladungen durch den

Calciumtransport bedingt dann eine Depolarisation der mitochondrialen Membran; als Kompensation sieht man eine Atmungsstimulierung und einen Efflux von Protonen. Die Elektronentransport-vermittelte H^+-Abgabe aus der Mitochondrienmatrix ist also mit der elektrophoretischen Calciumaufnahme gekoppelt mit einem H^+/Ca^{2+}-Verhältnis von 2 [10].

Die Calciumaufnahme, über deren molekularen Mechanismus noch recht wenig bekannt ist, hat eine hohe Maximalgeschwindigkeit und einen K_m-Wert, der weit höher liegt als die freie Calciumkonzentration im Cytosol [3,6,10]. Maximale Calciumaufnahmegeschwindigkeit mit 900 nMol Ca^{++}/min x mg Protein wird z.B. erreicht, wenn man den K^+-Diffusionsgradienten für eine Calciumaufnahme ausnützt; die Calciumaufnahme ist somit wesentlich größer als die maximale Abgabe von Protonen über die Atmungskette [13]. In situ allerdings begrenzt die extramitochondriale Calciumkonzentration die Geschwindigkeit der Calciumaufnahme; sie wird unter physiologischen Bedingungen durch Mg^{2+} verringert mit halbmaximaler Wirkung bei 0.5 - 1 mM [14,15]. Die Aufnahmekapazität für Calcium in Abwesenheit von Anionen liegt mit 100 nMol/mg wesentlich höher als der physiologische Gehalt an Calcium von 5 - 10 nMol/mg Protein [16]. Durch permeable Anionen, wie Phosphat, wird die Aufnahmekapazität erhöht, was durch ihre Erniedrigung bei Phosphat-Depletion [17] oder Inhibierung der Phosphataufnahme [18,19] belegt wird.

Die mitochondriale Calciumaufnahme über den Calciumuniporter wird durch Zugabe von EGTA oder niedrigen Konzentrationen von Ruthenium Rot (RR) gehemmt. Unter diesen Bedingungen tritt ein Calciumefflux mit einer langsamen kontinuierlichen Abgabe zu Tage. Außerdem kommt es zu einer leichten Inhibierung der Status 4-Atmung [20,21]. Die Ruthenium Rot-insensitive Calciumabgabe verläuft über einen elektroneutralen Austausch von Ca^{2+} gegen 2 H^+ oder 2 Na^+, abhängig von der Mitochondrienspecies. Der Ca^{2+}/Na^+-Austausch ist in der Leber sehr viel langsamer als in Herz- oder Gehirnmito-

chondrien [3,6]. Mechanismen und kinetische Parameter dieser Calciumeffluxwege wurden vor allem deshalb nicht intensiv studiert, weil die Bestimmung der freien Calciumkonzentration in der Matrix Schwierigkeiten bereitet. In Lebermitochondrien beträgt die Geschwindigkeit für den Ca^{2+}/H^{+}-Antiporter ungefähr 5 nMol/mg x min [22]. In anderen Mitochondrienspecies (Herz, Gehirn, Skelettmuskel, braunes Fettgewebe usw.) aktiviert Na^{+} den Calciumefflux [10], wobei species-abhängig die Abgabegeschwindigkeit über den Ca^{2+}/Na^{+}-Antiporter zwischen 4 und 18 nMol/mg x min variiert. Die maximalen Calciumeffluxraten über einen elektroneutralen Austausch gegen H^{+} oder Na^{+} sind somit ungefähr 100 mal langsamer als die des Calciuminfluxes über den Calciumuniporter. Die Calciumaufnahme über den Uniporter sowie die Calciumabgabe über den Antiporter bilden zusammen einen Calciumzyklus, der mit der Atmungskette über den elektrogenen Efflux von Protonen verbunden ist. Der Durchsatz dieses Calciumcycling ist unter Normalbedingungen allerdings gering; Gründe hierfür sind der hohe K_m für den Calciuminflux im Vergleich zur cytosolischen freien Calciumkonzentration und die niedrige Geschwindigkeit der Abgabe [23].

1.1.1. Einfluß von Phosphat auf Calciumbewegungen über die Mitochondrienmembran

Die Rolle von Phosphat beim mitochondrialen Calciumtransport war und ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Phosphat passiert die innere Mitochondrienmembran elektroneutral im Protonensymport und erlaubt dadurch eine Calciumakkumulierung in der Matrix ohne Alkalinisierung [3]. Daneben wird allgemein akzeptiert, daß Calcium und Phosphat in der Mitochondrienmatrix einen Komplex bilden. Bei der Ausbildung dieses Komplexes werden Protonen frei, die über die Atmungs-

kette ins Medium abgegeben werden [24]. Neben dem elektroneutralen Phosphat/Protonensymport wurden an Mitochondrien noch ein elektrogener Phosphattransport (über das Membranpotential getrieben) und der elektroneutrale Dicarboxylatantiporter beschrieben. Die verschiedenen Transportsysteme können vor allem durch ihr unterschiedliches Ansprechen auf Inhibitoren identifiziert werden [25,26].

Bereits seit 1964 ist bekannt, daß Phosphat bei Mitochondrien zu irreversibler Calciumabgabe und Atmungsstimulierung führen kann; als Ursache wird ein gesteigertes Calciumcycling gesehen [27]. Phosphat soll den Calciumuniporter aktivieren [28], als Calcium-Phosphatsymport an der Calciumaufnahme [28] oder Calciumabgabe [29] beteiligt sein. Zudem soll Phosphat einen weiteren Effluxweg [30] für Calcium stimulieren, unabhängig vom Redoxstatus der Pyridinnukleotide und ohne Zerstörung der Mitochondrien [30]. Nach anderen Arbeiten [31,32] führt Phosphat durch Absenken des Membranpotential über die Umkehr des Uniport-carrier und weniger über die Aktivierung eines unabhängigen Effluxes zu einer Calciumabgabe. Die dabei auftretende Atmungsstimulation wird nicht einem gesteigerten Calciumcycling, sondern einem verstärkten H^+-recycling zugeschrieben [32]. Ganz im Gegensatz dazu stehen die Arbeiten von Zoccarato und Nicholls [33]. Phosphat inhibiert danach die Calciumabgabe, indem es die freie Matrixcalciumkonzentration erniedrigt und damit der Efflux nicht in der Sättigung ablaufen kann.

Diese zum Teil recht widersprüchlichen Ergebnisse sind vor allem auf die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen zurückzuführen, wobei viele Parameter weder parallel bestimmt wurden noch mit der gleichen Methodik durchgeführt wurden. Erschwerend kommt noch eine Tendenz der Mitochondrien zur Instabilität, vor allem in Gegenwart von Phosphat, hinzu, wobei sie ihr Calcium in einem Zeitraum von 2 - 20 min. abgeben [34]. Diese spontane Calciumabgabe ist zeitabhängig und autokatalytisch; sie tritt erst oberhalb einer bestimmten Schwellenkonzentration auf. Inkubation der Mitochondrien in Gegenwart physiologischer Konzentrationen von Mag-

nesium und Adeninnukleotiden schützt vor dieser zeitabhängigen Verschlechterung der Mitochondrienqualität. Die spontane Abgabe von Calcium ist verknüpft mit katastrophalen Folgen für die Mitochondrien:

1. Eine unspezifische Permeabilitätserhöhung der inneren Mitochondrienmembran für Moleküle kleiner 1 500 Dalton [35].
2. Schwellung der Mitochondrienmatrix [36].
3. Abgabe von K^+ und Mg^{2+} aus der Matrix [37].
4. Abgabe von Adeninnukleotiden aus der Matrix [37].
5. Oxidation [38] oder Hydrolyse [39] von Matrixnikotinamidnukleotiden und Efflux von Nikotinamid.
6. Aktivierung der intramitochondrialen Phospholipase A_2 und Anhäufung von ungesättigten Fettsäuren [36,38].
7. Kollaps von $\Delta\psi$ [36,38,40].

Die Stabilität der Mitochondrien in Medien ohne Adeninnukleotide oder Mg^{2+} variiert von Gewebe zu Gewebe. Bei vorgegebener Phosphatkonzentration hängt die Überlebenszeit für die Mitochondrien direkt mit der Menge an zugegebenem Calcium zusammen, bei konstanter Calciumkonzentration beschleunigt eine Erhöhung der Phosphatkonzentration die spontane Calciumabgabe [27].

Zu den Faktoren, die Mitochondrien in Gegenwart von Phosphat stabilisieren, gehören Magnesium, ADP oder ATP [46], Bonkreksäure und Nupercain [36,38]. Weiter ist noch zu beobachten, daß eine Reihe weiterer Faktoren die Mitochondrien zu spontaner Calciumabgabe veranlassen können: Phosphoenolpyruvat [41], Atractylosid bzw. Carboxyatractylosid [42], Palmityl-CoA [43], erniedrigter pH [44] und ungesättigte Fettsäuren [45].

Beim gegenwärtigen Wissensstand ist die Beurteilung der physiologischen Bedeutung des durch Phosphat geförderten Calciumrelease schwierig. Man kann davon ausgehen, daß Phosphat im Cytosol in ausreichender Konzentration vorliegt, um den Abgabeweg zu aktivieren. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur wurde im Rahmen

dieser Dissertation versucht, die Rolle von Phosphat bei der Calciumabgabe systematisch zu untersuchen. Da die beschriebenen Effekte oft wegen unterschiedlicher Inkubationsbedingungen nicht vergleichbar sind, wurden alle relevanten Parameter unter gleichen Versuchsbedingungen gleichzeitig gemessen.

1.1.2. Zur Frage einer unabhängigen Calciumabgabe; Untersuchungen mit Ruthenium Rot

Die elektrophoretische Calciumaufnahme über den Uniporter und der damit zusammenhängende Transfer von zwei positiven Ladungen müßte im Gleichgewicht bei einem Membranpotential von 150 - 180 mV einen Konzentrationsgradienten von 10^5 - 10^6 über die Membran aufbauen. Trotz aller Schwierigkeiten bei der genauen Messung freier Calciumkonzentrationen stellte sich sehr bald heraus, daß der tatsächliche Gradient um mindestens 10^3-10^4 kleiner ist und damit der Uniporter das Gleichgewicht nicht erreicht. Aus dieser Erkenntnis heraus entwickelte sich rasch die Vorstellung, daß bei energetisierten Mitochondrien, die Calcium aufgenommen haben, der Efflux über vom Uniporter unabhängige Wege verlaufen müsse [siehe 47]. Der Uniporter operierte demnach als eine nach innen gerichtete "one-way"-Pumpe, die vom Membranpotential angetrieben würde, während die Abgabe von Calcium nach außen bei vollständig erhaltenem Membranpotential über ein unabhängiges System erfolgte.

Die Suche nach unabhängigen Abgabewegen wurde erfolgreich mit der Verwendung von Ruthenium Rot (RR). Die Ergebnisse von Moore [48] und anderen [49], daß Ruthenium Rot ein potenter Inhibitor für den mitochondrialen Calciuminflux ist, erwiesen sich als außerordentlich nützlich für die Etablierung eines unabhängigen Abgabesystems. In den letzten Jahren wurde dann der Begriff der mitochondrialen energieabhängigen Calciumaufnahme durch die Vorstellung des "mitochondrialen Calciumzyklus" verdrängt [6,50], bei welcher der energiegetriebenen Calciumaufnahme eine kontinuierliche Abgabe gegenübersteht, die unabhängig vom Membranpotential arbeitet.

Die Abgabe von Calcium aus Mitochondrien kann auch durch Calciumchelatoren [51], durch Agentien, die das Membranpotential zusammenbrechen lassen [52], durch Hemmung der Atmung [52] oder durch K^+-Diffusion in Valinomycin-behandelten Mitochondrien sichtbar gemacht werden [52]. Diese Abgabemöglichkeiten seien RR-sensitiv [52]. Andere Untersuchungen dagegen ergaben, daß der durch Enkoppler oder Hemmung der Atmung hervorgerufene Efflux RR-insensitiv ist [53]. Dieser separate Efflux ist nach heutiger Ansicht in Lebermitochondrien ein H^+/Ca^{2+}-Gegentausch [54] bzw. ein Na^+/Ca^{2+}-Gegentausch in Herzmitochondrien [21]. Vor kurzem erst wurde berichtet, daß RR bei Herzmitochondrien nach Behandlung mit Entkoppler eine Abgabe von endogenem Kalium hervorruft. Dabei wurde die Möglichkeit einer Veränderung des Uniporters mit K^+-Permeabilisierung diskutiert [55].

RR selbst bindet an die unterschiedlichsten Membrankomponenten; in der Anatomie dient es als Anfärbemittel für Glykoproteine. Über die Art der Bindung(en) und die Konsequenzen ist recht wenig bekannt. Rigoni et al. [52] schreibt die Einflüsse von RR auf die Calciumabgabe Änderungen in der Membranstruktur zu. Zusätzlich kann RR selbst eine Calciumabgabe bewirken; diese RR-insensitive Abgabe soll als Folge der Blockade des Calciumzyklus einen unabhängigen Effluxweg darstellen [20]. Jurkowitz et al. [56] beschreibt Bedingungen für einen RR-insensitiven Calciumefflux nach Entkopplergabe, die sehr gut mit den von Haworth und Hunter [57,58] beschriebenen übereinstimmen. Sie nannten die unspezifische Permeabilitätserhöhung der Mitochondrienmembran "Ca^{2+}-induced membrane transition".

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, daß der Einfluß von RR auf die Calciumabgabe recht komplexer Natur ist und sehr stark von den jeweiligen Inkubationsbedingungen abhängt.

1.2. Der Aktivitätskoeffizient von Calcium im Mitochondrium

Um den apparenten Aktivitätskoeffizienten für Calcium in der mitochondrialen Matrix zu bestimmen, wurden verschiedene Wege beschritten. Einmal untersuchte man die Beziehung zwischen Calciumgradient über die Mitochondrienmembran und dem Membranpotential. Für das elektrochemische Calciumgleichgewicht gälte die Beziehung der Nernst'schen Gleichung:

$$\Delta\psi = 2.3\,(R \cdot T / n \cdot F)\ \log\ [Ca^{2+}]_{in} / [Ca^{2+}]_{out}$$

Thermodynamisches Gleichgewicht des Calciumgradienten mit dem Membranpotential bedeutete Reversibilität des Ca^{2+}-Uniport. In der Tat konnte gezeigt werden, daß Membranpotential und Calciumtransport miteinander korrelieren; ein Abfall im Membranpotential, Alkalinisierung der Matrix sowie gesteigerte Atmung und Protonenefflux waren sichtbar, solange Calcium von Mitochondrien aufgenommen wurde [22,36, 59 - 62]. Die Tatsache, daß nach Zugabe von H^+-Ionophoren, die $\Delta\psi$ erniedrigen, es zu einer schnellen durch Ruthenium Rot hemmbaren Calciumabgabe kommt [52], wird als weiteres Indiz für die Reversibilität des Uniporters gewertet.

Man darf allerdings nicht übersehen, daß eine genaue Überprüfung der Gültigkeit der Nernst'schen Beziehung mangels zuverlässiger Methoden für eine Bestimmung der freien Calciumkonzentration in der Mitochondrienmatrix lange Zeit nicht möglich war. Rottenberg und Scarpa [63] verglichen die Verteilung von ^{86}Rubidium und ^{45}Calcium in Gegenwart von Valinomycin bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen. Unter der Annahme, daß in Gegenwart von Acetat das gesamte Calcium der Matrix frei vorliege, gehorchte der errechnete Calcium-Gradient der Nernst'schen Verteilung. Mn^{2+}, das auch von Calciumuniporter transportiert wird, kann im Gegensatz zu Calcium als freies Mn^{2+} mit Hilfe von Elektronenspinresonanzspektroskopie gemessen werden. Eine Über-

einstimmung mit der Nernst'schen Gleichung wurde bei Membranpotentialen kleiner als 80 mV gefunden; bei höheren Membranpotentialen allerdings ergaben sich zunehmend Abweichungen [64], bis zuletzt nur noch etwa 3 % in der Matrix frei vorlagen [47].

Nicholls [22] untersuchte die Beziehung zwischen der externen freien Calciumkonzentration im steady state und dem Membranpotential: Unter Annahme eines Aktivitätskoeffizienten von 0.1 für das Matrixcalcium stimmten bis 120 mV die experimentellen Daten mit den aus der Nernst'schen Gleichung errechneten überein; darüber hinaus fand auch Nicholls keine Übereinstimmung mehr.

Die Arbeitsgruppe von Williamson [65] entwickelte vor kurzem eine Methode für die direkte Bestimmung der freien mitochondrialen Calciumkonzentration. Bei ihrer "Nullpunkts-Titrationstechnik" werden Ruthenium Rot (Inhibierung des Ca^{2+}-Uniporter) und der Calciumionophor A 23187 (Erleichterung von $Ca^{2+}/2H^{+}$-Austausch) zugegeben; nach Äquilibrierung ist der Gradient des freien Calcium dem pH-Gradienten proportional. Die extramitochondriale Calciumkonzentration, bei der es zu keiner Calciumaufnahme bzw. -abgabe kommt, zusammen mit dem gemessenen pH-Gradienten erlauben die Berechnung der intramitochondrialen freien Calciumkonzentration nach

$$[Ca^{2+}]_{Mito} / [Ca^{2+}]_{extra} = ([H^{+}]_{Mito} / [H^{+}]_{extra})^{2}$$

Für energetisierte Lebermitochondrien ergibt sich in Abwesenheit von Acetat ein apparenter Aktivitätskoeffizient von 8×10^{-4} [65]. Mitochondrien aus der Rattenleber enthalten nach Isolation zwischen 5 - 15 nMol Gesamtcalcium/mg Protein und damit 4 - 12 µM freies Calcium; bei Inkubation ohne Magnesium erreicht die extramitochondriale freie Calciumkonzentration 0.5 - 0.6 µM. Es resultiert ein Calciumgradient von 5 - 25 abhängig vom Calciumgehalt der Mitochondrien [65]. Aus diesen Untersuchungen folgt, daß in intakten Zellen der Calciumgradient bei ungefähr 50

liegen dürfte und sich damit von dem aus der Nernst'schen Beziehung errechneten Konzentrationsgradienten um vier Größenordnungen unterscheiden sollte. Das offensichtliche thermodynamische Ungleichgewicht deutet darauf hin, daß unter physiologischen Bedingungen der Calciumefflux vor allem über den $Ca^{2+}/2H^{+}$-Antiporter verläuft und weniger über den Ca^{2+}-Uniporter [23].

Die Fragestellung nach der freien mitochondrialen Calciumkonzentration wurde von Denton und McCormack [7] von einer ganz anderen Seite her angegangen. Sie untersuchten die Ca^{2+}-Abhängigkeit von mitochondrialen Dehydrogenasen und fanden, daß ihre Aktivitäten durch Calcium gesteigert werden mit halbmaximalen Effekten bei Calciumkonzentrationen von 0.5 - 1.5 µM . Da eine sinnvolle Regulation der Calcium-abhängigen Enzyme nur in diesem Bereich stattfinden sollte, interpretieren sie ihre Ergebnisse dahingehend, daß bei gekoppelten Mitochondrien ein nennenswerter Calciumgradient über die Mitochondrienmembran nicht existieren sollte.

1.3. Mitochondriales Calciumcycling und seine physiologische Bedeutung

Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre an Lebermitochondrien [22,66,67] und Arbeiten von Carafoli [6] und Crompton [8] an Herzmitochondrien haben eine mögliche Bedeutung des Calciumcycling ins Blickfeld gerückt, nämlich daß vor allem in der Leber die kinetischen Eigenschaften des mitochondrialen Calciumtransportes für die freie Calciumkonzentration im Cytosol und der Matrix wesentlich sind.

Im steady state existiert eine extramitochondriale freie Gleichgewichtskonzentration von 0.4 - 0.8 µM Calcium [22]. Störungen des Gleichgewichts durch Zugabe kleiner Ca^{2+}-Mengen oder EGTA führt zu Aufnahme bzw. Abgabe von Calcium durch die Mitochondrien [67]. Die zelluläre Rolle des Calciumcycling wäre dann die Einstellung der extramitochondrialen freien Calciumkonzentration. Diese würde sich dann ändern, wenn sich die kinetischen Eigenschaften von Cal-

ciuminflux oder -efflux änderten, was sich in vitro z.B. durch Mg^{2+}-Gabe (Erhöhung des K_m-Wertes des Calcium-Uniporters) bzw. bei Herz- oder Hirnmitochondrien durch Na^+-Gabe (Aktivierung des Calciumeffluxes) mit einer Erhöhung der steady state Konzentration des externen Calciums demonstrieren ließ [65].

Nicholls [22] zeigte, daß die äußere freie Calciumkonzentration vom mitochondrialen Calciumgehalt bis zu Werten von 60 nMol/mg Protein nicht abhängt. Er folgerte, daß die Calciumeffluxrate unabhängig von der freien Matrixcalciumkonzentration sei. Offensichtlich läßt er aber hier die Calciumbindung durch einen begrenzten Phosphatpool außeracht. Neuere Untersuchungen ergaben eine strenge Abhängigkeit der extramitochondrialen freien Gleichgewichts-Calciumkonzentration vom intramitochondrialen freien Calcium bei Gesamt-Calciumgehalten von weniger als 5 nMol/mg Protein. Die freie Calciumkonzentration in der Matrix liegt damit unter dem K_m-Wert für den Calciumefflux. Als Konsequenz daraus werden Mitochondrien nur dann das freie Calcium im Cytosol abpuffern, wenn ihr Calciumgehalt größer ist [22], während bei geringeren Calciumgehalten die cytosolische freie Calciumkonzentration direkten Einfluß auf das mitochondriale Calcium nehmen wird [7].

In intakten Leberzellen beeinflussen die Calciumpumpen der Plasmamembran und des endoplasmatischen Retikulums die freie cytoplasmatische Calciumkonzentration und damit das mitochondriale Calciumcycling. Beide Systeme haben im Vergleich zu den Mitochondrien niedrige Aufnahmegeschwindigkeiten ($<$10 nMol/min x mg), ihre K_m-Werte für Calcium liegen aber im Bereich von 1 µM [23]. Im Gleichgewicht wird somit der mitochondriale Calciumgehalt und die steady state-Verteilung durch die Aktivität dieser Systeme mitbestimmt werden [66].

2. Z I E L D E R A R B E I T

1. In den letzten 10 - 15 Jahren wurde die Calciumabgabe aus Rattenlebermitochondrien in Gegenwart von Phosphat intensiv untersucht (3,24 - 33). Aufgrund von unterschiedlichen Inkubationsbedingungen und Methoden ergaben sich sehr kontroverse Befunde, die von einer Stimulierung der Calciumabgabe [30 - 32] bis hin zu einer Inhibierung [33] reichen. In dieser Dissertation sollte die Wirkung von Phosphat auf die Calciumabgabe bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen systematisch untersucht und seine mögliche physiologische Bedeutung abgeschätzt werden.

2. Nach dem heutigen Wissensstand bilden Calciuminflux über einen elektrogenen Uniporter und ein unabhängiger Efflux über einen Ca^{2+}/H^{+}-Antiporter in Rattenlebermitochondrien ein Calciumcyclingsystem [22,23,47]. Diese Anschauung beruht im Wesentlichen auf der Entdeckung, daß Ruthenium Rot spezifisch den Calciuminflux hemmt [48,49]. Neuere Untersuchungen allerdings ließen Zweifel an der Richtigkeit dieser Vorstellung aufkommen [7,56,65]. Die Widersprüche veranlaßten uns, die Calciumabgabe nach Ruthenium Rot in Gegenwart von Phosphat genauer zu untersuchen, wobei alle energetischen Parameter parallel gemessen wurden.

3. Nach Rottenberg und Scarpa [63] verteilt sich Calcium - in Gegenwart von Acetat - entsprechend dem Membranpotential $\Delta\psi$ über die Mitochondrienmembran. In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob unter den speziellen Bedingungen von Rottenberg und Scarpa Calcium auch wirklich osmotisch aktiv vorliegt. Denn inzwischen ist unbestritten, daß Calcium in Gegenwart von Phosphat und in in situ Mitochondrien zum größten Teil gebunden vorliegt [50].

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Materialien

3.1.1. Versuchstiere

Für alle Experimente wurden männliche Wistar-Ratten aus eigener Zucht mit 200-300 g Körpergewicht verwendet. Die Tiere erhielten Altromin-Trockenfutter und Wasser ad libitum. Sie wurden bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit bei einem 12 h Tag/Nacht-Zyklus gehalten.

3.1.2. Chemikalien

N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) und Albumin aus Rinderserum stammten von Serva Feinbiochemica, Heidelberg; Tetraphenylphosphoniumchlorid und Aethylenglykol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure wurden von Fluka AG, Buchs (Schweiz) bezogen. Rotenon, Valinomycin, Acetoacetat und Ruthenium Rot waren von Sigma GmbH, München, wobei das Ruthenium Rot durch Umkristallisieren zum Ruthenium-Braun-Nitrat gereinigt wurde [68]. Der Entkoppler CCP und Adenosin-5'-diphosphat (ADP) waren von Boehringer GmbH, Mannheim; alle übrigen Substanzen von der Firma Merck AG, Darmstadt.

Silikonöle: Für die jeweiligen Inkubationsmedien wurde eine Mischung hergestellt aus den Typen AR 20 und AR 200 der Firma Wacker Chemie, München. In unserem Fall für das Saccharosemedium: Ar 20 24.5 ml, Ar 200 225 ml, für das KCl: AR 20 96.2 ml, AR 200 81.7 ml, wobei sich die Verhältnisse allerdings mit der Silikonölcharge leicht ändern können.

3.1.2. Radiochemikalien

^{3}H-Acetat-Na-salz (5 mCi/0.5 ml) in Äthanol, ^{14}C(U)-Sucrose (3.6 mCi/mMol) und $^{45}CaCl_2$ (4 - 50 Ci/g) wurden von NEN Chemicals, Dreieich bezogen; ^{86}RbCl (1 - 8 mCi/mg), ^{32}P-Orthophosphat, trägerfrei, in verdünnter HCl pH 2-3 (2 mCi/ml), Hydroxy(^{14}C)-methylinulin (13.5 mCi/mMol), ^{14}C-Methyltriphenylphosphoniumjodid (1.08 µCi/ml) von Amersham Buchler GmbH.

Als Szintillator wurde Unisolve 1 von Koch-Light Laboratories Ltd. verwendet.

3.1.4. Medien

Isolationsmedium:

Saccharose	250 mM
TRAP-HCl	5 mM
EGTA	0.5 mM
BSA	1 mg/ml

pH 7.2 wurde mit 1 M Tris eingestellt.

Inkubationsmedien:

a) Saccharosemedium

Saccharose	250 mM
MOPS/Tris	10 mM
$MgCl_2$	2.4 mM

pH 7.3 wurde mit 1 M Tris eingestellt.

b) Kaliummedium

KCl	125 mM
MOPS/Tris	10 mM
$MgCl_2$	2.4 mM

pH 7.3 wurde mit 1 M Tris eingestellt.

Alle weiteren Medien anderer ionaler Zusammensetzung waren Mischungen aus a) und b).

3.1.5. Geräte

Zentrifugen: Beckman J 21 B mit Rotor JA 20, München, Hettich AHT 5200-Tischzentrifuge, Tuttlingen, Eppendorf-Tischzentrifugen 3200 und 5412, Beckman Microfuge 152.

Photometer: Eppendorf, Netheler und Hinz/Hamburg.

Zentrifugenröhrchen (Nr.701) für Silikonzentrifugation aus Polyäthylen der Fa. Sarstedt, Nümbrecht.

Szintillationsfläschchen "mini vials" 5 ml, Fa. Zinsser, Frankfurt.

Sämtliche Radioaktivitätszählungen wurden in einem Flüssigkeitsszintillationszähler BF 5001 der Fa.Berthold/Wildbach mit einem angeschlossenen programmierbaren Algotronic-Rechner der Fa. Diehl durchgeführt.

Die Sauerstoffbestimmung wurde mit einer Sauerstoffelektrode nach Clark mit angeschlossener Verstärker- und Schreibereinrichtung vorgenommen. Die Messungen erfolgten in einem auf 26°C thermostatisierten geschlossenen Gefäß von 2.3 ml Gesamtvolumen; ein kleiner Magnetrührer sorgte für eine schnelle Durchmischung.

3.2. Methoden

3.2.1. Isolation der Mitochondrien

Methodisches Vorgehen und Dauer der Präparation wurden genau standardisiert. Die Ratten wurden durch Genickschlag getötet und ausgeblutet; die Leber wurde dann entnommen, in auf 0°C vorgekühltes Isolationsmedium (3.1.4.) gebracht und in 30 - 40 ml eiskaltem Isolationsmedium unter Eiskühlung mit einem Potter-Homogenisator bei 150 Umdrehungen/min vorsichtig homogenisiert (nur eine Auf-/Abwärtsbewegung !). Das Homogenat wurde in gekühlte Zentrifugenbecher überführt und in der Beckmanzentrifuge bei 3°C zentrifugiert. Bei diesem ersten langsamen Lauf wurde der Rotor zunächst auf 5 000 UpM beschleunigt und dann sofort auf stop zurückgestellt; da nicht abgebremst wurde, dauerte dieser Lauf ca. 5 min. Der Überstand wurde vom Sediment aus ganzen Zellen und Zellkernen abdekantiert und bei 11 000 UpM für 2 min. rezentrifugiert. Die oben schwimmende Fettschicht wurde mit saugfähigem Papier entfernt, der Überstand verworfen und das Mitochondriensediment in 30 ml gekühltem Isolationsmedium aufgenommen und vorsichtig durchmischt. Nach zweimaligem Waschen bei 11 000 UpM für 2 min. wurde das Mitochondriensediment in einem 5 ml Potter von Hand vorsichtig homogenisiert.
Die Ausbeute betrug 90 - 100 mg Mitochondrienprotein/Leber.

3.2.2. Qualitätskontrolle

Unmittelbar nach der Präparation wurde der Atmungskontrollquotient (ACR: Acceptor-Control-Ratio) mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode bestimmt [69]. Luftgesättigtes Inkubationsmedium wurde in das Meßgefäß gefüllt, verschlossen und auf 26°C thermostatisiert. Für die Bestimmung der absoluten Atmungsraten wurde für 26°C eine Sauerstoffmenge von 250 nMol O_2/ml (250 µM) zugrundegelegt. Nach Eichung wurden die Mitochondrien in einer Endkonzentration von ungefähr 1 mg/ml zugegeben und die Einstellung der Basisatmung abgewartet. Nach Zugabe von 1 µM Rotenon und 4 mM Succinat stellte sich die Status 4-Atmung ein. Nach 1-2 Minuten wurden zunächst 1 mM Phosphat und dann 200 nMole ADP zugesetzt und damit die Status 3-Atmung ("aktive Atmung") erreicht, die nach ADP-Verbrauch in den Status 4 ("kontrollierte Atmung") zurückging. Der ACR errechnet sich dann aus [70]:

$$ACR = \frac{\text{Atmungsrate im Status 3}}{\text{Atmungsrate im Status 4 nach ADP-Verbrauch}}$$

Die Atmungskontrollquotienten betrugen 5.5 ± 1.0 ($n \geq 20$)

3.2.3. Proteinbestimmung

Nach der Biuret-Methode [71] wurde das Mitochondrienprotein mit TCA (Endkonzentration 0.3 M) ausgefällt, 5 min. auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 2.5 ml Biuret-Reagenz aufgelöst. Nach 10 Minuten in der Dunkelheit wurde die Extinktion bei 546 nm gemessen; ein Leerwert ohne Protein wurde mitgemessen. Nach Zugabe von KCN verschwand die Blaufärbung und der Proteinleerwert, der durch die Trübung zustande kommt, konnte ermittelt werden.

$$\frac{(E_1 - E_2 - E_o) \times F}{A} = \text{mg Protein/ml}$$

wobei: E_1 = Extinktion der Gesamtprobe
E_2 = Extinktion nach KCN-Zugabe
E_o = Extinktion des Biuret-Reagenz Leerwert
A = Volumen der Mitochondrien (µl)
F = konstanter Faktor, für 2.5 ml Biuret-Reagenz 8.8 bei 1 cm Schichtlänge.

3.2.4. Versuchsdurchführung

3.2.4.1. Inkubation der Lebermitochondrien

Die Mitochondrien wurden in den verschiedenen Medien bei 26°C inkubiert; die Endkonzentration der Mitochondrien lag bei 1.1 mg Protein/ml. Um eine gleichmäßige Durchmischung zu erreichen und die O_2-Aufnahme zu verbessern, wurde die Suspension mit einem Magnetrührer gerührt. Das Gesamtvolumen eines Inkubationsansatzes betrug 2.7 ml; die Inkubationen wurden durch Zugabe von Mitochondrien gestartet.

In einem Inkubationsansatz A wurde das mitochondriale Matrixvolumen und das Membranpotential bestimmt. In 1 ml Inkubationsansatz befanden sich 5 nCi ^{86}RbCl, 400 nCi ^{14}C-Sucrose bzw. ^{14}C-Inulin zur Bestimmung des mitgerissenen extramitochondrialen Volumens und Intermembranraumes und 1.2 µCi $^{3}H_2O$ für die Bestimmung des Gesamtwassers. Zur Verhinderung der Adsorption von ^{86}RbCl an mitochondriale Membranen wurde 90 µM RbCl als Träger zugegeben.

In einem parallelen Ansatz B mit gleicher Proteinkonzentration wurde die Aufnahme bzw. Abgabe von Phosphat und Calcium sowie das ΔpH über die ^{3}H-Acetatverteilung bestimmt. Im ml Ansatz waren enthalten:5 nCi ^{32}P-Orthophosphat, 20 nCi ^{45}Ca-Calciumchlorid und 1 µCi ^{3}H-Acetat sowie 90 µM Natriumacetat als Träger. Zur Bestimmung des Membranpotentiales über die Verteilung von ^{14}C-Triphenylphosphoniumchlorid wurde ein weiterer paralleler Ansatz C notwendig. Er enthielt pro ml 50 nCi ^{14}C-TPP, 20 nCi ^{36}Cl-Natriumchlorid sowie 90 µM Tetraphenylphosphoniumchlorid.

3.2.4.2. Silikonzentrifugation

Die Methode wurde für Mitochondrien von Werkheiser und Bartley [72] und Pfaff [73] entwickelt. Dabei wurden je 200 µl der Mitochondriensuspension in ein Zentrifugenröhrchen auf eine Silikonschicht pipettiert, deren Dichte über der des Mediums, aber unter der der Mitochondrien lag. Während einer Zentrifugation von 25 Sekunden in der Wasser-gekühlten Beckmann Microfuge wandern die Mitochondrien durch die Silikonschicht hindurch in eine wässrige Enteiweißungsschicht von 50 µl 3 M KOH. Der Überstand wurde dabei nahezu proteinfrei.

Beim Durchtritt durch die Silikonschicht reißen die Mitochondrien etwas Medium mit, das zusammen mit dem Intermembranraum über die in diesem Volumen gelöste Menge an ^{14}C-Sucrose bzw. ^{14}C-Inulin bestimmt wurde.

3.2.4.3. Probenaufarbeitung

Bei der Silikonzentrifugation wurden jeweils 50 µl 3 M KOH als Enteiweißungsmittel eingesetzt, in der sich das Mitochondriensediment über Nacht bzw. bei 50°C in 3 - 4 h vollständig auflöste. Für die Herstellung gleicher Verdünnungsverhältnisse und gleicher Säurekonzentrationen in Überstand und Sediment wurden 50 µl Überstand mit 50 µl 3 M KOH, 50 µl 5 M TCA und 150 µl aqua bidest. versetzt. Zum Sediment in 50 µl 3 M KOH wurden 50 µl 5 M TCA und 200 µl aqua bidest. zugegeben. Die so verdünnten Sedimente und Überstände wurden mit 3.5 ml Unisolve gezählt. Parallel zu den Inkubationsansätzen wurden zur Bestimmung der Nullrate und der Einstreufaktoren in die drei Zählkanäle des Szintillationszählers Proben mit gleicher Proteinkonzentration, aber ohne Radioaktivität, inkubiert. Von diesen Proben wurden Doppelwerte aus Überstand und Sediment aufgearbeitet und für die Einstreufaktoren jeweils 50 µl verdünnte Radioaktivität zugesetzt. Bei der Berechnung der insgesamt eingesetzten Radioaktivität wurde der unterschiedliche Proteinquench in Sediment und Überstand berücksichtigt.

3.2.4.4. Radioaktivitätszählung

In einem Berthold-Szintillationszähler BF 5001 mit angeschlossenem Diehl-Algotronic-Rechner wurden in der Probenserie A mitgerissenes Volumen und Matrixvolumen sowie das Membranpotential, in der Probenserie B die aufgenommene Calcium- und Phosphatmenge sowie das ΔpH über die innere Mitochondrienmembran mit Hilfe entsprechender Rechenprogramme ermittelt.

Die drei Radionuklide ^{86}Rb, ^{14}C-Saccharose/^{14}C-Inulin und $^{3}H_2O$ bzw. ^{3}H-Acetat, $^{45}Calcium$ und $^{32}Phosphat$ wurden nebeneinander in den 3 Kanälen des Szintillationszählers gemessen. Für die Berechnung wurden die Zählausbeute sowie die eingestreuten Aktivitäten in den anderen Kanälen über Faktoren bestimmt und berücksichtigt [74].

I. Extramitochondriales Volumen

$$V_{Suc} = \frac{B_S}{B} \cdot V$$

B_S : ^{14}C-Sucrose-Aktivität im Sediment (Kanal B)
B : Gesamtaktivität in 50 µl
V : gezähltes Volumen (50 µl)
V_{Suc} : mitgerissenes extramitochondriales Volumen (µl/Probe)

II. Matrixvolumen

$$V_{Mito} = \frac{C_S}{C} \cdot V - V_{Suc}$$

C_S : $^{3}H_2O$-Aktivität im Sediment (Kanal C)
C : Gesamtaktivität in 50 µl
V_{Mito} : Matrixvolumen (µl/Probe)

III. Membranpotential

Rb^+ verteilt sich in Gegenwart des Ionophors Valinomycin ebenso wie K^+ entsprechend dem elektrochemischen Potential [75]; man kann deshalb mit Hilfe der Nernst'schen Gleichung aus der ^{86}Rb-Verteilung das Membranpotential

berechnen:

$$E = \frac{R \times T}{1 \times F} \ln \frac{[Rb]_a}{[Rb]_i}$$

$[Rb]_a$: extramitochondriale Rb^+-Konzentration
$[Rb]_i$: intramitochondriale Rb^+-Konzentration

$$\frac{[Rb]_a}{[Rb]_i} = \frac{A_U \cdot V}{A_S \cdot V_{Mito} - A_U \cdot V_{Suc}}$$

A_U : ^{86}Rb-Aktivität in 50 µl Überstand
A_S : ^{86}Rb-Aktivität in 50 µl Sediment (Kanal A)

IV. Bestimmung von gebundenem Calcium und Phosphat

Calcium (als ^{45}Ca) und Phosphat (als $^{32}P_i$) wurden nach der folgenden Formel berechnet:

$$Ca_{geb.} \left[\frac{nmol}{mg\ protein} \right] = \frac{c}{p} \left(\frac{B_S}{B} \cdot V - V_{Suc} \cdot p \right)$$

c : Ca-Konzentration (mM)
p : Proteingehalt in mg/200 µl Probe
$B = B_U + {}^1/_4\ B_S$: Gesamtaktivität in 50 µl

V. Berechnung des ΔpH über die ^3H-Acetatverteilung

Mit zunehmender Energetisierung der Mitochondrien (d.h. steigendem pH_i) wird ^3H-Acetat als undissoziierte Säure verstärkt in die Mitochondrien aufgenommen. Im Gleichgewicht gilt:

$$\Delta pH = \lg \frac{[^3HAc]_i}{[^3HAc]_a} = \frac{(C_S - C_{mitgeriss.})/V_{mito}}{C_U/V} =$$

$$\frac{(C_S - C_{mitgeriss.}) \cdot V}{C_U \cdot V_{mito}}$$

C_S : ^{3}H-Acetat-Aktivität im Sediment (Kanal C)

C_U : ^{3}H-Acetat-Aktivität im Überstand

$C_{mitgeriss.}$: $\frac{C_U}{\mu l} \times V_{Suc}$

4. E R G E B N I S S E

4.1. Calciumabgabe nach Phosphat

4.1.1. Energetische Parameter, Volumina und Ionenbewegungen nach Phosphat

Für die Calciumabgabe nach Phosphat aus isolierten Mitochondrien ist eine hohe Permeabilität für monovalente Kationen notwendig [76]. Diese ionale Bedingung kann einmal durch Valinomycin bei moderaten Kaliumkonzentrationen oder durch eine hohe Kaliumkonzentration selbst erhalten werden. Aus diesem Grunde wurden alle Experimente in dieser Arbeit, die die Wirkung von Phosphat auf die Calciumabgabe untersuchen, in einem Medium mit 125 mM K^+ (vgl.3.1.4.) durchgeführt.

Abb.1 zeigt den Einfluß von Phosphat auf die Calciumabgabe; als Kontrolle wurde parallel eine Inkubation ohne Phosphat mitgeführt. Die angebotene Calciummenge war so konzipiert, daß sie per se (vgl.Abb.3) noch nicht zu einer Calciumabgabe führte. Phosphat führt nach einer Lag-Phase zu schneller Calciumabgabe, wobei auch das aufgenommene Phosphat parallel abgegeben wird (Abb.1a). Abb.1c zeigt sehr eindrucksvoll, daß sofort nach Phosphatgabe der für [^{14}C]-Saccharose zugängliche Raum stark zunimmt; die Schwellung der Mitochondrien geht eindeutig der Calciumfreisetzung voraus, wobei die Abgabe etwa bei der halbmaximalen Schwellung einsetzt. Der Verlauf des Matrixvolumen (Abb.1c) gibt nicht, wie auf den ersten Blick zu vermuten, eine Schrumpfung wieder, sondern vielmehr die Permeabilisierung der Mitochondrien für Saccharose unter Matrixschwellung, da der Anstieg im Saccharoseraum den Abfall im Saccharose-nicht-zugänglichen Raum weit übersteigt. In Abb.1b ist der Verlauf von ΔpH und Membranpotential abgebildet. Da die Mitochondrien unmittelbar nach Phosphatgabe schwellen und für Saccharose permeabel werden, können an dieser Stelle mit Saccharose keine echten Matrix-Volumina mehr ermittelt werden.

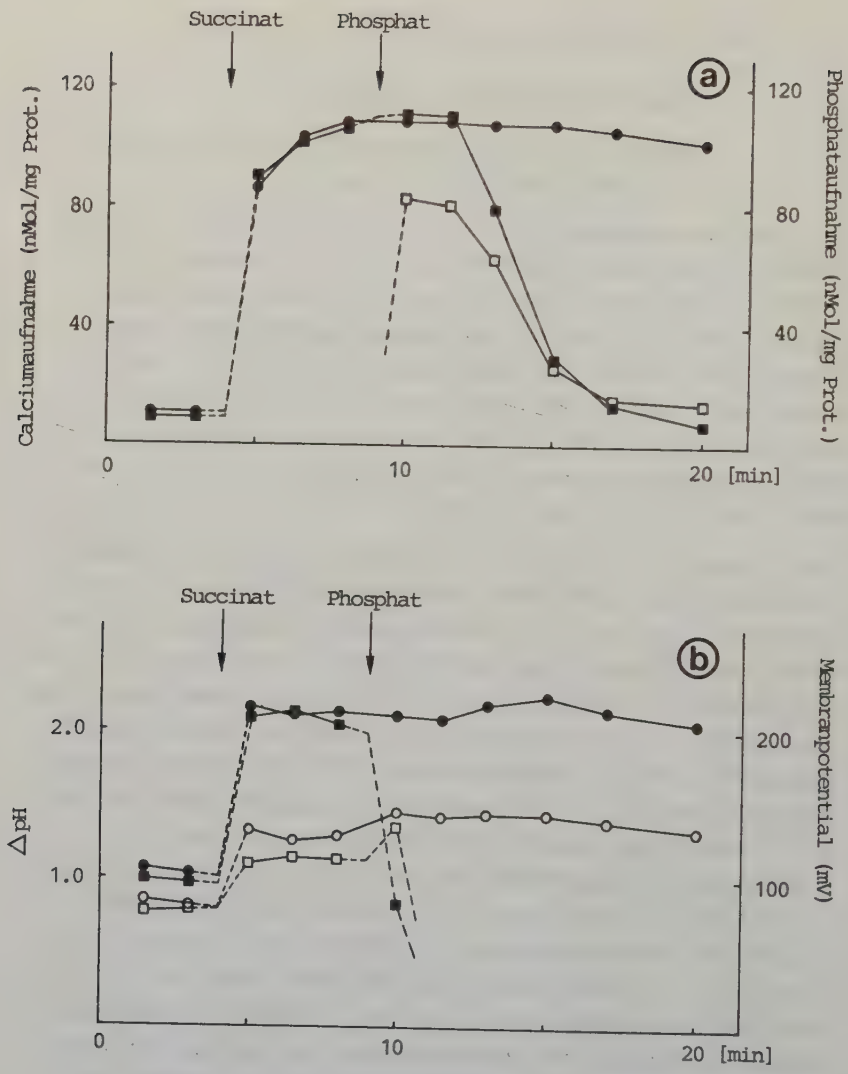
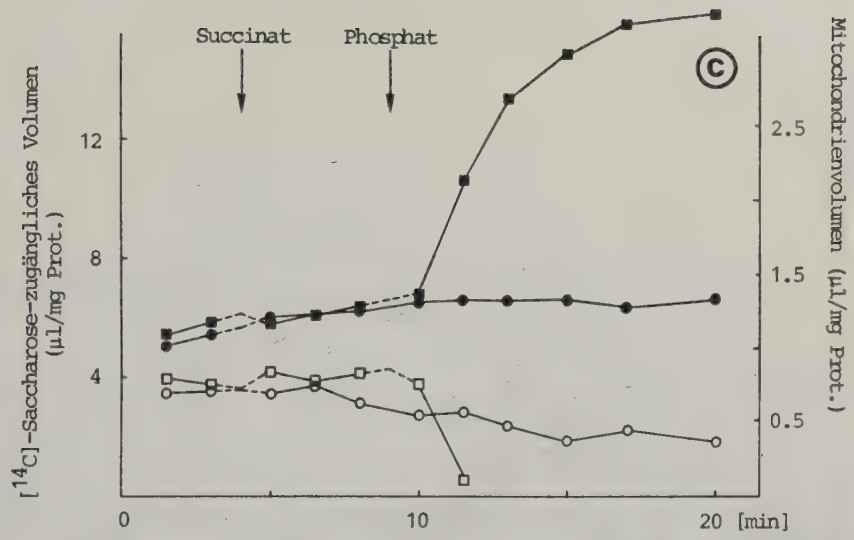


Abb.1: Mitochondriale Parameter nach Energetisierung durch Succinat und Phosphatgabe bei hoher K^+-Permeation.

Rattenlebermitochondrien (1.08 mg/ml) wurden in parallelen Inkubationsansätzen in 2.7 ml Medium (125 mM K^+, 10 mM Mops/Tris, 2.4 mM Mg pH 7.3) bei 26°C inkubiert. Die Zugabe waren: 5µM Rotenon und 0.148 mM Calcium zu Versuchsbeginn, 4 mM Succinat nach 4 Minuten und 1 mM Phosphat nach 9 Minuten. Für die Bestimmung der mitochondrialen Parameter wurden die



verschiedenen Radionuklide gemäß 3.2.4.1. eingesetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 200 µl Proben zur Silikonzentrifugation abgenommen.

Folgende Symbole wurden verwendet:

(□—□) bzw. (■—■) Zugabe von Phosphat
(○—○) bzw. (●—●) kein Phosphatzusatz

Die ausgefüllten Symbole beziehen sich immer auf die linke, die offenen Symbole auf die rechte Seite.

a) Calcium und Phosphat
Calcium ohne Phosphatzugabe (●—●), mit Phosphat (■—■);
Phosphat (□—□).

b) Membranpotential und △pH
△pH: ohne Phosphat (●—●), mit Phosphat (■—■)
MP : ohne Phosphat (○—○), mit Phosphat (□—□)

c) Extramitochondrialvolumina und Matrixvolumina
Schwellung : ohne Phosphat (●—●), mit Phosphat (■—■)
Matrixvolumen: ohne Phosphat (○—○), mit Phosphat (□—□)

Allerdings kann man davon ausgehen, daß nach der irreversiblen Calciumabgabe, verbunden mit Schwellung und Permeabilisierung, über die Mitochondrienmembran weder ein △pH noch ein nennenswertes Membranpotential bestehen bleibt.

4.1.2. Antagonistische Wirkung von Phosphat auf die Calciumabgabe in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration

Energetisierung von Mitochondrien durch Succinat bei pH 7.3 führt zu einer konzentrationsabhängigen Calciumaufnahme (Abb.2).

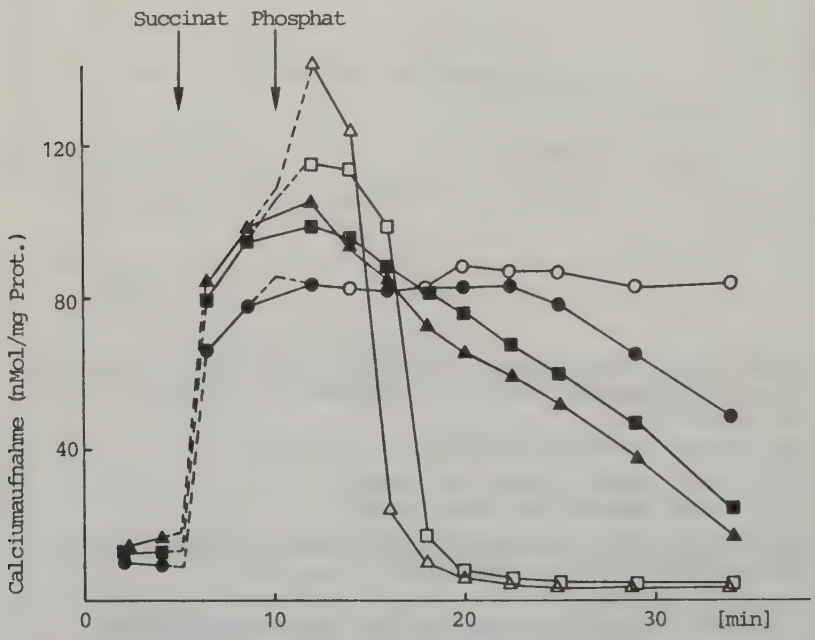


Abb.2: Abhängigkeit der Calciumaufnahme von der Calciumkonzentration: Einfluß von Phosphat.

Inkubationsbedingungen wie in Abb.1, allerdings wurde nur Calcium gemessen. Die Zugaben erfolgten bei den Pfeilen.

Die Kontrollen (geschlossene Symbole) enthielten:
(●—●) 0.111 mM Ca^{2+}; (■—■) 0.148 mM Ca^{2+}; (▲—▲) 0.185 mM Ca^{2+}

Mit Phosphatzusatz (offene Symbole):
(○—○) 0.111 mM Ca^{2+}; (□—□) 0.148 mM Ca^{2+}; (△—△) 0.185 mM Ca^{2+}

Ohne weitere Zugaben wird Calcium langsam abgegeben, wobei der Beginn der Abgabe von der Calciumkonzentration abhängt. Zugabe von Phosphat führt zu unterschiedlichen Konsequenzen

für die Calciumabgabe: Während bei niedrigen Calciumkonzentrationen die Abgabe verhindert wird, wird sie bei höheren Konzentrationen nach einer Lag-Phase beschleunigt. Die Abgabe geht einher mit Schwellung und Permeabilisierung der Mitochondrien (vgl.Abb1c).

4.1.3. Einfluß von Phosphat auf die Calciumaufnahme

Die Fähigkeit von Mitochondrien, Calcium in Gegenwart von Phosphat vermehrt zu speichern, wird in Abb. 3 dargestellt.

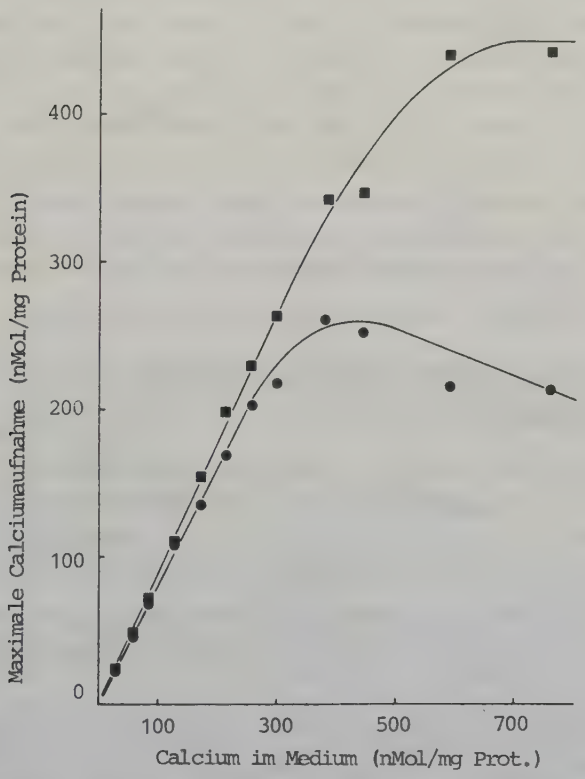


Abb.3: Abhängigkeit der maximalen Calciumaufnahme von der Calciumkonzentration: Einfluß von Phosphat.

Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen von Abb.2; Succinat und Phosphat wurden bereits bei Inkubationsbeginn zugegeben. Zur Ermittlung

der maximalen Calciumaufnahme wurde wie folgt vorgegangen: Im 15 Sekundenabstand wurden 2 Minuten lang - mit Hilfe von zwei Zentrifugen - Proben abzentrifugiert; selbst bei der höchsten Calciumkonzentration war noch eine Calciumaufnahme sichtbar, sodaß die angegebene Calciummenge auch wirklich dem maximal aufgenommenen Calcium entspricht.
(■—■) mit Phosphat, (●—●) ohne Phosphat

Calciumaufnahme von Mitochondrien in Abwesenheit von Phosphat wurde schon sehr früh als "limited loading" beschrieben, verbunden mit einer Atmungshemmung im Status 6 [77,78]. Aus Abb.2 ist ersichtlich, daß die begrenzte Calciumaufnahme durch spätere Zugabe von Phosphat aufgehoben werden kann. Bei niedrigen Calciumkonzentrationen ist die maximale Calciumaufnahme mit und ohne Phosphat gleich, während sie bei höheren Konzentrationen (>300 nMol Ca^{++}/mg Protein) durch Phosphat gesteigert wird (Abb.3). Unter den Bedingungen einer hohen K^{+}-Permeation beträgt die maximale Aufnahme mehr als 400 nMol Calcium/mg Protein. Durch Phosphat wird die anschließende Calciumabgabe beschleunigt und der Zeitraum bis zur Abgabe immer kleiner im Vergleich mit Inkubationen ohne Phosphat (vgl.Abb.2).

4.1.4. Gegenläufige Wirkung von Phosphat in Abhängigkeit vom pH

In Abb.4 wurde der Einfluß von Phosphat auf die Calciumabgabe bei drei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration untersucht. Die maximale Calciumaufnahme bei der jeweiligen Calciumkonzentration wurde als 100% angesetzt und die zugehörige Abgabe nach einer bestimmten Zeit (in Abb.4 15 Minuten) darauf bezogen; Phosphat wurde von Anfang an zugesetzt.

Bei niedrigem pH und ohne Phosphat setzt die Calciumabgabe schon bei geringeren Calciumbeladungen ein als bei hohem pH. Diese Abhängigkeit vom pH wird in Gegenwart von Phosphat noch ausgeprägter: Phosphat initiiert einerseits die Calciumabgabe bei pH 6.8 schon bei niedrigeren Calciumkonzentrationen bzw. Calciumbeladung der Mitochondrien, ver-

hindert sie andererseits aber nahezu vollständig bei pH 7.6 (Abb.4). Bei dem dazwischen liegenden pH 7.2 ist mit Phos-

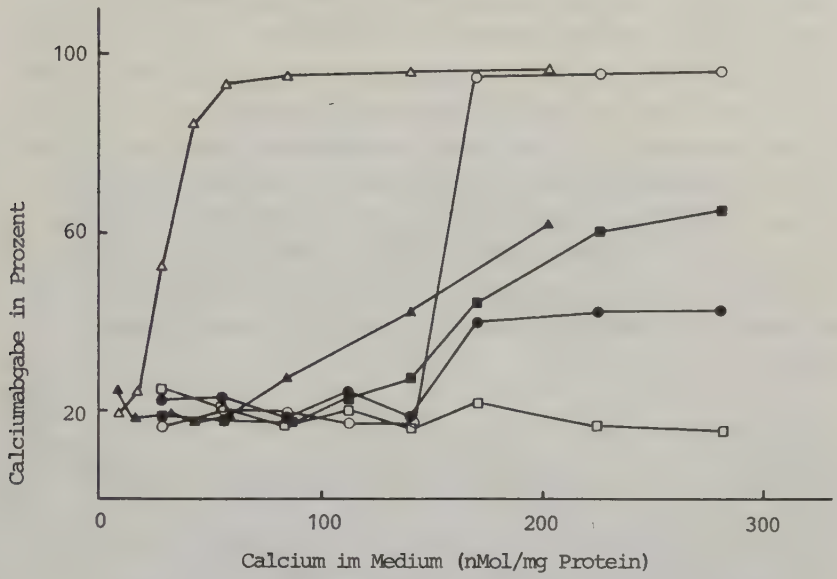


Abb.4: Abhängigkeit der Calciumabgabe von pH und Phosphat

Die Inkubationsbedingungen waren wie in Abb.3; der Calciumgehalt in den Mitochondrien wurde nach 15 Minuten mit der maximal aufgenommenen Calciummenge verglichen und die Abgabe in % gegen die angebotene Calciummenge aufgetragen.

Kontrollen ohne Phosphatzusatz:
(■–■) pH 7.6; (●–●) pH 7.2; (▲–▲) pH 6.8

Mit Phosphatzusatz:
(□–□) pH 7.6; (○–○) pH 7.2; (△–△) pH 6.8

phat die Abgabe bei niedrigen Calciumgehalten geringfügig geringer, bei höheren aber verstärkt stimuliert.

Phosphat kann demnach, abhängig von pH und Calciumgehalt, unterschiedliche Wirkungen auf die Calciumabgabe der Mitochondrien zeigen. Während Phosphat bei relativ niedrigen Calciumkonzentrationen die Calciumabgabe verhindert, hebt es bei höheren Calciumkonzentrationen die Begrenzung der Calciumaufnahme auf und beschleunigt in diesem Bereich die Calciumabgabe stark. Dieser antagonistische Einfluß von

Phosphat auf die Calciumretention zeigt sich auch bei der pH-Abhängigkeit. Bei hohem pH erhöht es die Aufnahme von Calcium und verhindert seine Abgabe, bei niedrigem pH dagegen verstärkt es die Abgabe sehr stark.

In drei Experimenten mit verschiedenen Mitochondrienpräparationen wurde bei pH 7.6 die Wirkung von Phosphat auf die Calciumabgabe und die damit verbundene Schwellung untersucht. Um im selben Inkubationsansatz beide Parameter bestimmen zu können, wurde für die Ermittlung der Schwellung anstelle von [^{14}C]-Saccharose [^{36}Cl]-Natriumchlorid eingesetzt [79]. Abb.5 zeigt klar, daß bei Lebermitochondrien der Saccharose- und der Chlorid-permeable Raum übereinstimmen.

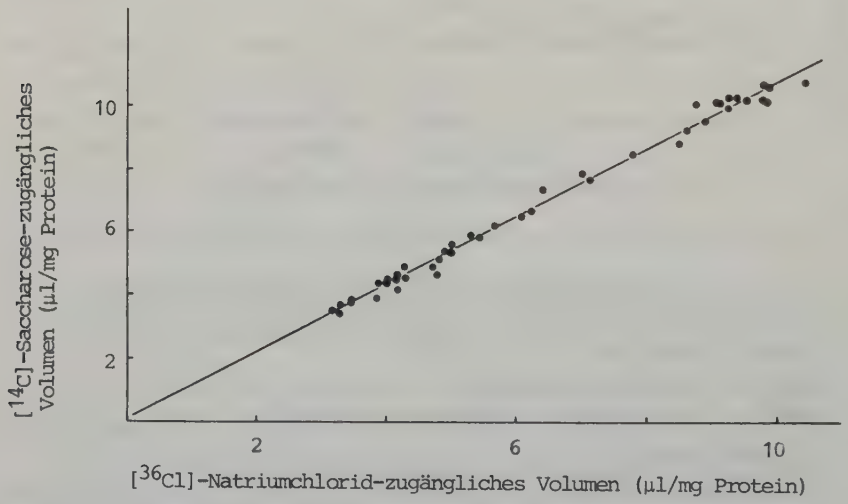


Abb.5: Bestimmung von Extramitochondrialvolumina (Schwellung) mit Hilfe von [^{14}C]-Saccharose und [^{36}Cl]-Natriumchlorid.

Inkubationsbedingungen wie in Abb.3. Die Daten stammen von 4 unabhängigen Experimenten mit unterschiedlicher Reihenfolge der Zugaben, sodaß alle möglichen Inkubationsbedingungen erfaßt worden sind.

Der Verlauf von Calciumabgabe und Schwellung sind in Abb.6 in Abhängigkeit von der angebotenen Calciummenge dargestellt, wobei im Gegensatz zu Abb.4 der Zeitpunkt 28 min.

nach Versuchsbeginn ausgewählt wurde. Ohne zugesetztes Phosphat beginnt die Calciumabgabe langsam oberhalb von 100 nMol Ca^{2+}/mg Protein und erreicht bei einem Angebot von 300 nMol/mg einen Wert von über 90% der zuvor aufgenommenen Calciummenge (Abb.6a).

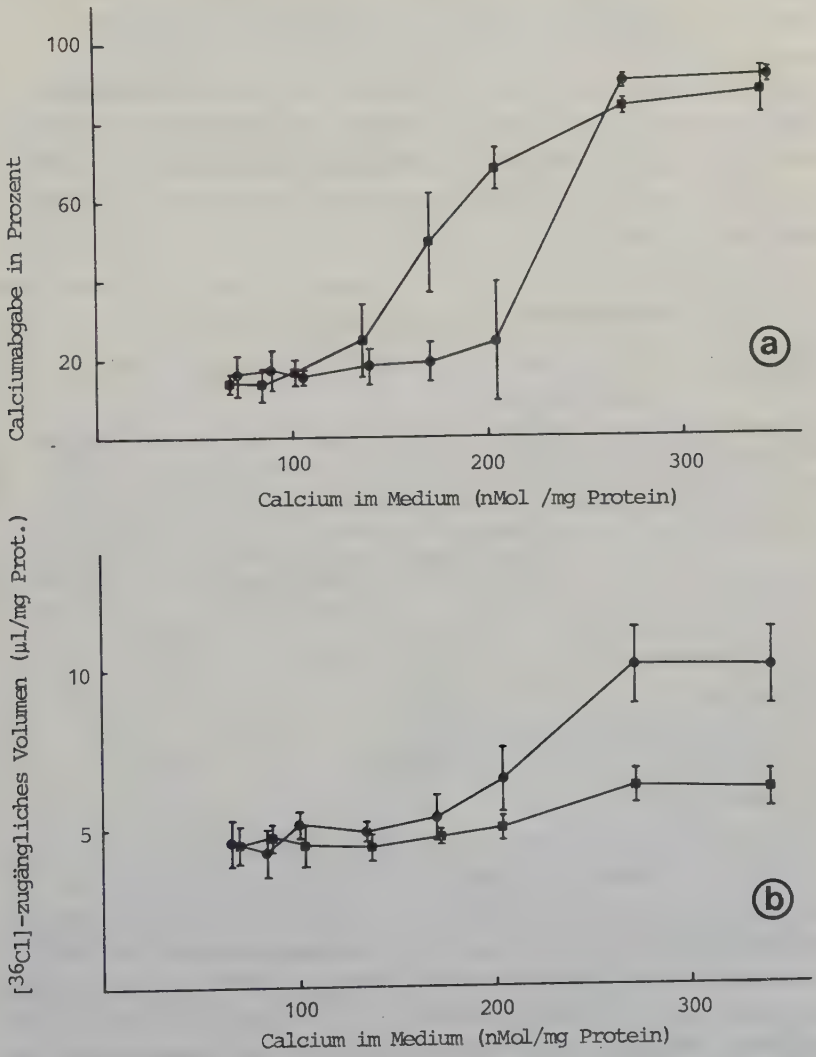


Abb.6: Abhängigkeit der Calciumabgabe (a) und der Schwellung (b) von der Calciumkonzentration: Protektive Wirkung von Phosphat.

Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen von Abb.3, der pH betrug 7.6. Der Calciumgehalt und der für [^{36}Cl]-Chlorid-zugängliche Raum als Maß für eine Schwellung - zum Zeitpunkt 28 Minuten nach Inkubationsbeginn - wurden analog Abb.4 ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.D. von drei Experimenten angegeben. (●–●) mit Phosphat, (■–■) ohne Phosphat

Zugabe von Phosphat verhindert die Calciumabgabe bis etwa 200 nMol Calcium/mg Protein, beschleunigt sie aber oberhalb dieser Konzentration dramatisch. In Abwesenheit von Phosphat ändert sich der für [^{36}Cl]-Chlorid-zugängliche Raum erst oberhalb von 200 nMol/mg; mit Phosphat beginnt die Schwellung bereits bei geringeren Calciummengen und erreicht bei hohen Calciumkonzentrationen sehr viel grössere Werte (Abb.6b).

Die Abgabe von Calcium nach Acetoacetat zeigt Ähnlichkeiten mit der durch Phosphat bei niedrigem pH (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einfluß von Acetoacetat und Phosphat auf die Calciumabgabe.

Die Inkubationsbedingungen waren wie in Abb.4. Die Zugaben Phosphat (1mM) und Acetoacetat (5mM) erfolgten bei Inkubationsstart. Die Auswertung erfolgte, wie in Abb.4 beschrieben, für den Zeitpunkt 22 Minuten. +) Hier trat bis 320 nMol Ca^{2+} überhaupt keine Abgabe auf.

Zugabe	Calciumkonzentration (nMol/mg Protein), die für eine halbmaximale Calciumabgabe notwendig ist.	
	pH 6.8	pH 7.6
Kontrolle	200	250
Phosphat	120	- +)
Acetoacetat	120	170
P_i + Acetoacetat	20	- +)

Bei pH 6.8 verschieben Acetoacetat und Phosphat die Calciumkonzentration, die für eine halbmaximale Calciumabgabe notwendig ist, zum selben Wert. Beide permeablen Anionen zusammen wirken synergistisch und senken die für die halbmaximale Calciumabgabe notwendige Calciumkonzentration auf den sehr niedrigen Wert von 20 nMol Ca^{2+}/mg Protein ab. Bei pH 7.6 dagegen wirken Phosphat und Acetoacetat gegen-

läufig: Während Phosphat die Abgabe inhibiert (vgl.Abb.4), erniedrigt Acetoacetat die für eine halbmaximale Abgabe nötige Calciummenge. Zusätzliche Gabe von Phosphat hebt den Einfluß von Acetoacetat auf die Calciumabgabe auf.

4.1.5. Vielfältige Einflüsse von Phosphat und Calcium auf die destruktive Calciumabgabe

Die Wirkung von Phosphat und Calcium auf die Calciumabgabe hängen von Zeitpunkt und Reihenfolge der Zugaben ab. Ohne Phosphat tritt eine verzögerte Abgabe ein (Abb.7). Diese

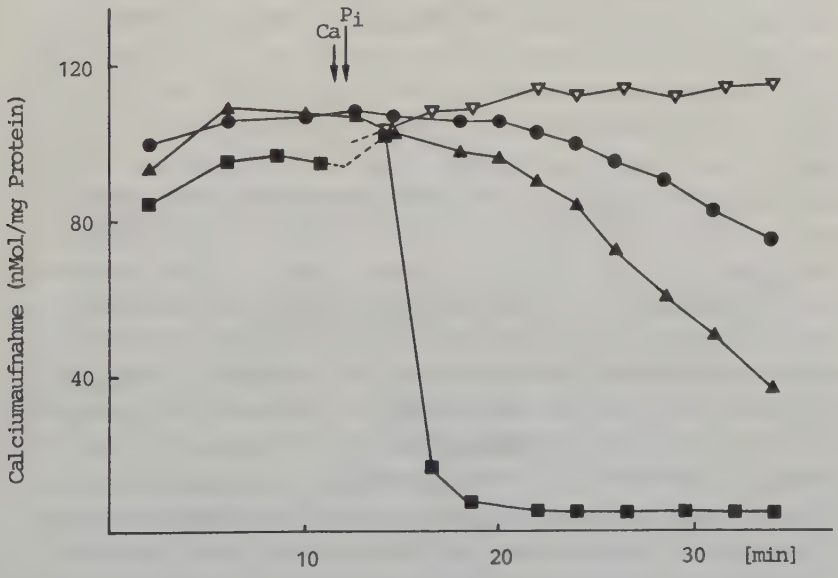


Abb.7: Vielfältige Einflüsse von Calcium und Phosphat auf die destruktive Calciumabgabe.

Inkubationsbedingungen wie in Abb.2; die Calciumkonzentration betrug 0.148 mM. Die Zugaben waren: (▲—▲) keine Zugaben, (●—●) Phosphatgabe bei Inkubationsbeginn, (■—■) Phosphatgabe bei 12 Minuten, (▽—▽) Phosphat bei 12 Minuten, Calcium bei 11.5 Minuten.

ist weiter verlangsamt bei gemeinsamer Zugabe von Calcium und Phosphat von Anfang an. Gibt man Phosphat erst im Verlauf der Inkubation zu, dann hängt die Calciumabgabe von

der Dauer der Vorinkubation in Gegenwart von Calcium ab: Wird Calcium bei Inkubationsbeginn und Phosphat 12 Minuten danach gegeben (Abb.7), so führt dies nach kurzer Zeit zu momentaner Calciumabgabe; erfolgt die Calciumzugabe bei 11.5 Minuten erst unmittelbar vor der Phosphatzugabe, so bleibt die Calciumabgabe aus. Die Inkubation von Mitochondrien in Gegenwart von Calcium und Abwesenheit von Phosphat ist demnach die Voraussetzung, um nach Phosphatgabe eine möglichst rasche Calciumabgabe zu erzielen.

Um einen genaueren Einblick in die Calcium-induzierten Änderungen, die sich nach Phosphatgabe zeigen, zu bekommen, wurden weitere Experimente analog Abb.7 bei zwei verschiedenen Calciumkonzentrationen durchgeführt und in Tabelle 2 zusammengefaßt. Für den Vergleich der verschiedenen Inkubationsbedingungen wurde der Zeitpunkt der halbmaximalen Calciumabgabe nach Phosphatgabe als Maß genommen für die jeweiligen destruktiven Änderungen. Calcium wird immer dann am schnellsten abgegeben, wenn vor der Phosphatgabe in Gegenwart von Calcium atmungsgehemmte Mitochondrien vorinkubiert wurden. Auf der anderen Seite wurde überhaupt keine Abgabe beobachtet bei energetisierten Mitochondrien, die nur ihr endogenes Calcium ($\sim$10 nmol/mg Protein) enthielten. Inkubationen, die entweder Calcium und Succinat oder keine Zugabe enthielten, ergaben mittlere Abgabezeiten. Ein Vergleich der beiden Calciumkonzentrationen ergibt in allen Fällen eine frühere Calciumabgabe bei der höheren Calciumkonzentration (vgl.Abb.2). Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Calcium in Mitochondrien diese für eine Phosphat-induzierte Calciumabgabe anfällig macht; diese Destabilisierung kann durch Energetisierung und Phosphatgabe von Anfang an reduziert werden.

Tabelle 2 : Abhängigkeit der Calciumabgabe von unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Calcium, Succinat und Phosphat.

Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen von Abb.7; die Auswertung erfolgte wie in Abb.4 beschrieben, allerdings wurde die halbmaximale Freisetzung nach Phosphatgabe angegeben.

	Zeitpunkt der Zugabe (min) Calcium	Succinat	Phosphat	Zeit (min) für halbmaximale Abgabe nach Phosphatzusatz
	0	10	20	3
0.148 mM	0	0	20	5
Calcium	10	10	20	10
	10	0	20	-+)
	0	10	20	7
0.111 mM	0	0	20	18
Calcium	10	10	20	20++)
	10	0	20	-+)

+) keine Abgabe während der Inkubation
++) weniger als 50 % -Abgabe während der Inkubation

4.1.6. Inhibierung der Calciumabgabe nach Phosphat durch Ruthenium Rot und Magnesium

Ohne weitere Zugaben wird Calcium langsam bis auf maximal 60 nmol Ca^{2+}/mg Protein aufgenommen und danach langsam abgegeben mit einer halbmaximalen Abgabe bei 25 Minuten (Abb.8). Zusatz von Phosphat führt zu einer zusätzlichen Calciumaufnahme und nach einer Lag-Phase zu einer beschleunigten Abgabe. Die Erhöhung der Magnesiumkonzentration auf 5.4 mM beeinträchtigt die zusätzliche Calciumaufnahme nach Phosphat nicht, verhindert aber vollständig die Phosphat-induzierte Calciumabgabe. Ein ähnlicher Effekt konnte durch die Gabe von Ruthenium Rot unmittelbar nach Phosphatzusatz erzielt werden: Abgesehen von einer anfänglich geringfügig raschen Abgabe wird Calcium langsam mit einer Rate von 0.5 nMol/mg x min abgegeben, die vollständige schnelle Abgabe wird aber verhindert. Durch Zugabe von EGTA zur Komplexierung des extramitochondrialen Calcium ergibt sich ein ähn-

licher Verlauf für die Calciumabgabe wie bei der Aufnahmehemmung durch Ruthenium Rot.

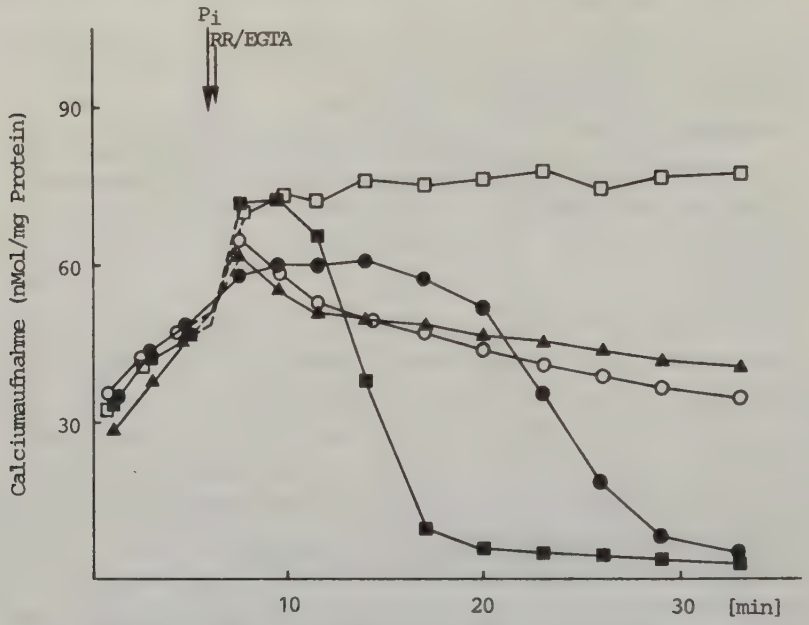


Abb.8: Hemmung der Phosphat-induzierten Calciumabgabe durch Mg^{2+} und Ruthenium Rot oder EGTA.

Die Inkubationsbedingungen waren wie in Abb.3, die Calciumkonzentration war 0.111 mM, Succinat wurde zu Beginn zugegeben. Die Zugaben waren: (●—●) keine Zugaben, (■—■) Phosphat, (□—□) Phosphat und Mg^{2+} (5.4 mM von Beginn an), (▲—▲) Phosphat und Ruthenium Rot (5 nMol/mg Protein), (○—○) Phosphat und 2 mM EGTA.

Die Änderungen der übrigen mitochondrialen Parameter sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Membranpotential und ΔpH konnten, wenn nur Phosphat zugesetzt worden war, nicht bestimmt werden, da wegen Schwellung und Permeabilisierung für Saccharose eine Volumenbestimmung nicht möglich war. Die Erhöhung der Magnesiumkonzentration verhindert eine Schwellung nach Phosphat vollständig; in Gegenwart von Ruthenium Rot erhöht sich das für Saccharose-zugängliche Volumen langsam. Nach Phosphat-Gabe fällt das ΔpH und das Membranpotential erhöht sich sowohl in Gegenwart von Magnesium als auch von Ruthenium Rot.

Tabelle 3: Inhibierung der Phosphat-induzierten Calciumabgabe durch Ruthenium Rot und Magnesium.

Inkubationsbedingungen wie in Abb.8; 0.148 mM Calcium wurden zu Beginn zugegeben. Phosphat bei 11.5 Minuten und Ruthenium Rot (5 nMol/mg) bei 12 Minuten.

Zugabe	Zeit[+)]	Schwellung[++)]	Calcium[*)]	Phosphat[*)]	Membran-potential[**)]	pH
	13.5	7.53	94.8	-	134.2	1.6
-	15.5	7.47	94.7	-	129.3	1.5
	17.5	7.62	96.9	-	128.7	1.5
	13.5	11.84	91.6	96.9	-	-
Phosphat	15.5	14.27	59.5	66.6	-	-
	17.5	14.63	12.6	23.5	-	-
Phosphat u.	13.5	8.21	86.1	74.3	162.6	0.87
Ruthenium	15.5	8.54	81.9	76.8	170.3	0.87
Rot	17.5	9.50	76.2	71.3	173.0	0.89
Phosphat	13.5	7.87	94.5	69.3	167.7	0.85
und	15.5	7.69	95.8	79.5	177.3	1.06
Magnesium	17.5	8.10	96.4	84.9	172.0	1.02

[+)]Minuten [++)]µl/mg Protein [*)]nMol/mg Protein [**)]mV

4.2. Einfluß von Ruthenium Rot auf die Calciumabgabe nach Phosphat

Ruthenium Rot, ein Inhibitor der Calciumaufnahme über den Uniporter [48-50], macht durch die Hemmung der Calciumaufnahme einen unabhängigen physiologischen Abgabeweg sichtbar [47,50]. Ziel der folgenden Untersuchungen war, die Natur des nach Ruthenium Rot-Gabe sichtbaren Effluxes in Gegenwart von Phosphat näher zu charakterisieren.

4.2.1. Biphasische Calciumabgabe nach Ruthenium Rot

In parallelen Inkubationsansätzen wurden zu energetisierten Mitochondrien nach verschiedenen Zeiten Phosphat und 15 Sekunden später Ruthenium Rot (RR) zugegeben; Calcium wurde

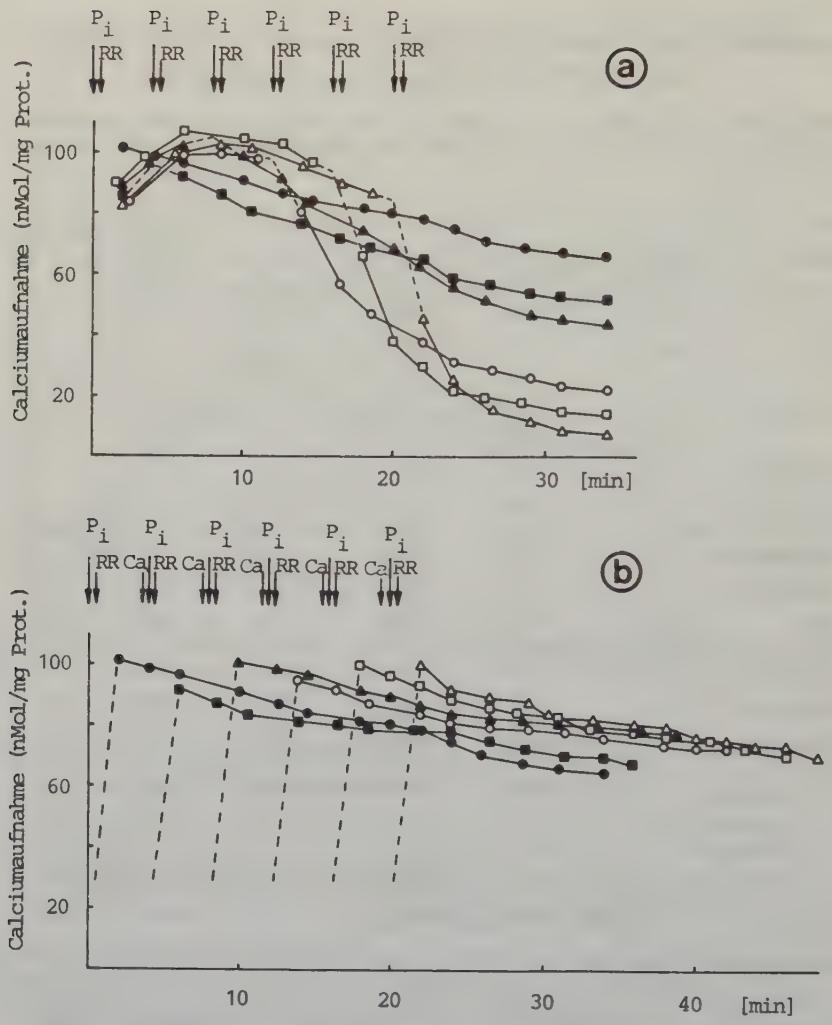


Abb.9: Biphasische Calciumabgabe nach Ruthenium Rot, Vorinkubation mit und ohne Calcium.

Inkubationsbedingungen wie in Abb.7. Die Zugaben erfolgten an den entsprechenden Pfeilen. Die Zugaben (1 mM Phosphat und 15 Sekunden später 5 nMol RR/mg) waren: (●—●) 0 Minuten, (■—■) 4 Minuten, (▲—▲) 8 Minuten, (○—○) 12 Minuten, (□—□) 16 Minuten, (△—△) 20 Minuten.

a: Vorinkubation in Gegenwart von 0.148 mM Calcium

b: Zugabe von 0.148 mM Calcium jeweils 30 Sekunden vor der Zugabe von Phosphat und RR.

bei Versuchsbeginn zugesetzt. Die Calciumkonzentration wurde so gewählt, daß sie ohne weitere Zugaben nicht schon alleine eine Calciumabgabe zur Folge hat.

Um die Phosphat-induzierte Calciumabgabe in Gegenwart von RR zu studieren, wurde ihre Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit in Gegenwart von Calcium untersucht; Phosphat und RR wurden zu sechs verschiedenen Zeitpunkten zugesetzt. Abb.9a faßt die Ergebnisse zusammen. Mit zunehmender Vorinkubationszeit der Mitochondrien in Gegenwart von Calcium wird nach der RR-Gabe neben der langsamen Calciumabgabe eine schnelle Calciumabgabe sichtbar. Während Abgaberate und Ausmaß der ersten schnellen Abgabe bei Verlängerung der Vorinkubation zunehmen, ergibt sich für die zweite langsame Abgabe in allen Fällen eine ähnliche Abgabegeschwindigkeit (Abb.9a).

Um den Einfluß von Calcium während der Vorinkubation auf die spätere Calciumabgabe zu studieren [80], wurden parallel zu den Versuchen von Abb.9a energetisierte Mitochondrien ohne Calcium vorinkubiert und Calcium erst 30 Sekunden vor den übrigen Zugaben zugesetzt. Sollte Calcium eine entscheidene Rolle bei der Ausbildung der zweiten schnellen Abgabe spielen, so müßten sich drastische Unterschiede bei Versuchen mit und ohne Vorinkubation bezüglich Calcium manifestieren. Bei dieser Betrachtungsweise muß man allerdings davon ausgehen, daß die Inkubation von energetisierten Mitochondrien ohne exogen zugesetztes Calcium keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Calciumabgabe hat (vgl.Abb.10). Abb.9b zeigt die Bedeutung von Calcium für die anschließende Phosphat-induzierte Calciumabgabe. Man erhält bei der Vorinkubation in Abwesenheit von Calcium und anschließender Zugabe von Phosphat und RR praktisch sechs identische Kurven, die nur aufgrund der zeitlich verschiedenen Zugaben verschieden zu sein scheinen. Schiebt man alle Kurven so übereinander, daß die Zugaben zum gleichen Zeitpunkt erfolgen, dann sind sie deckungsgleich.

Zur besseren Übersicht sind in Abb.10 anhand von zwei Zeitpunkten für die Zugaben nochmals die Calciumabgabe in Abhängigkeit von der Vorinkubationsdauer bzw. Präsenz von Calcium dargestellt.

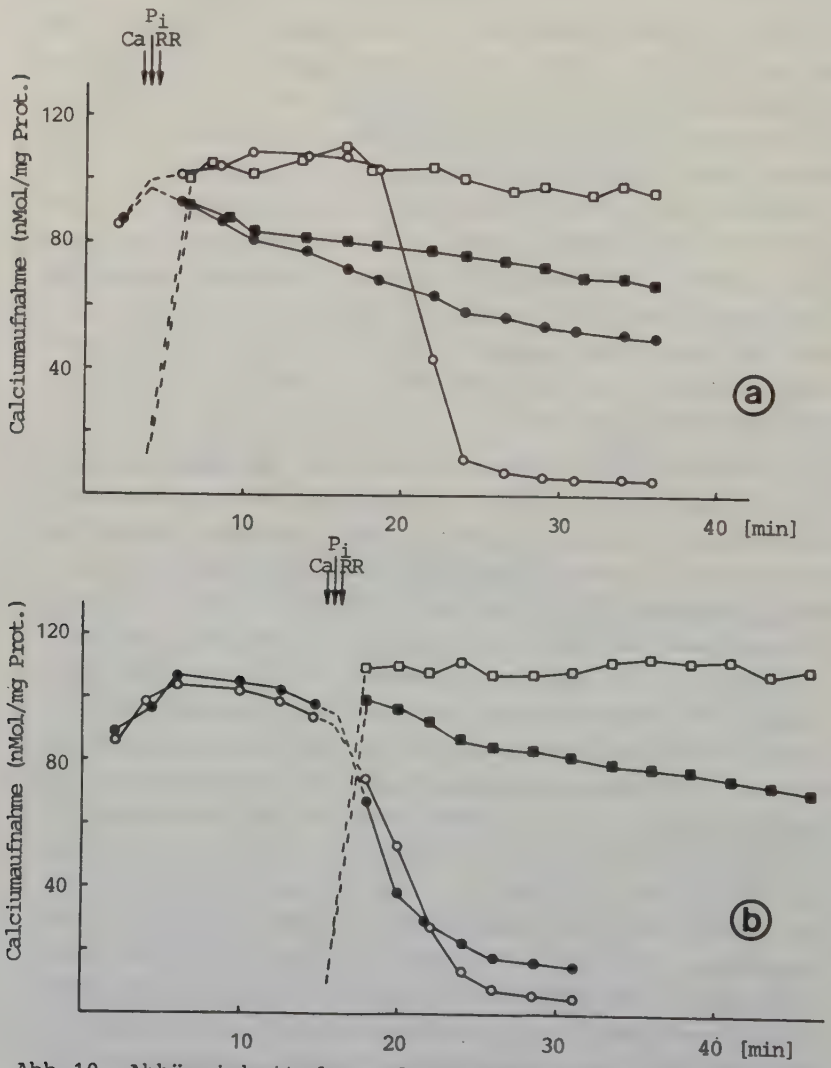


Abb.10: Abhängigkeit der Calciumabgabe von der Vorinkubation; Einfluß von Phosphat und Ruthenium Rot

Inkubationsbedingungen wie in Abb.7. Die offenen Symbole (○;□) beziehen sich auf Inkubationen ohne RR, die geschlossenen(●;■) auf Proben mit RR. (○;●)Calcium von Anfang an, (□;■) Calciumzusatz bei 3.5 Minuten (a) und 15.5 Minuten (b).

Zum weiteren Vergleich sind auch die Inkubationen, denen Phosphat aber kein RR zugesetzt wurde, mitaufgetragen. Zusammenfassend ergibt sich das folgende Bild: Bei der Inkubation von energetisierten Mitochondrien in Gegenwart von Calcium und anschließender Gabe von Phosphat und RR kommt es mit zunehmender Vorinkubation zu einer schnellen Abgabe von Calcium. Setzt die Calciumabgabe bei Mitochondrien, die nur Phosphat erhalten haben, sofort nach der Phosphatgabe ein, dann kann man diese schnelle Abgabe auch durch sofortige Gabe von RR nicht mehr verhindern: Beide Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf (Abb.10b). Dauert es allerdings eine gewisse Zeit, bis die Phosphat-induzierte Calciumabgabe einsetzt, dann wird durch die Gabe von RR die schnelle Abgabe vollständig unterdrückt (Abb.10a). Bei einer Vorinkubation in Abwesenheit von Calcium mit anschließender Gabe von Calcium kurz vor den weiteren Zugaben sieht man mit RR nur die langsame Abgabe (vgl.Abb.9b), während bei Inkubationen, die nur Phosphat enthalten, die Abgabe sogar verhindert wird unabhängig von der Dauer der Vorinkubation (Abb.10 a, b).

4.2.2. Calciumabgabe und Schwellung von Mitochondrien in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit

Abb.11 zeigt den Verlauf von Schwellung und Calciumretention nach Zugabe von Phosphat und RR zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Bei einer kurzen Vorinkubation von 5 Minuten wird Calcium nach RR-Gabe langsam mit konstanter Geschwindigkeit abgegeben; das für [^{14}C]-Saccharose-zugängliche Volumen vergrößert sich nach Phosphat-Gabe geringfügig und bleibt dann konstant. Bei größeren Vorinkubationszeiten in Gegenwart von Calcium zeigt die Calciumabgabe nach RR eine biphasische Kinetik. Zuerst wird ein bei zunehmender Vorinkubation größer werdender Anteil des zuvor akkumulierten Calcium schnell abgegeben; die anschließende langsame Abgabe nähert sich den Abgaberaten, die man ohne bzw. nach nur kurzer Vorinkubation beobachtet. Schließlich wird der

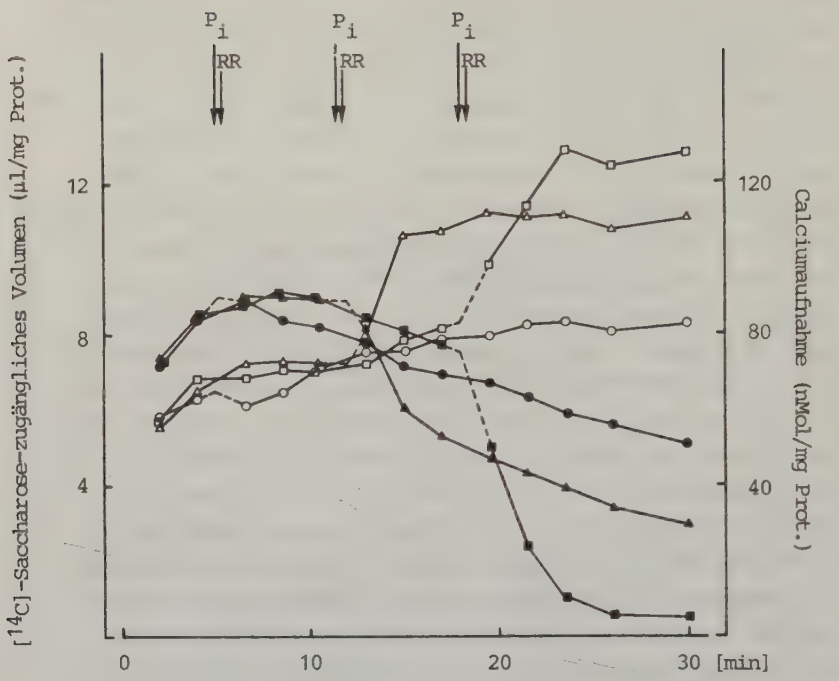


Abb.11: Calciumabgabe und Schwellung nach Phosphat: Einfluss von Ruthenium Rot

Die Inkubationsbedingungen waren wie in Abb.8, Phosphat (1 mM) und RR (5 nMol/mg Protein) 15 Sekunden später wurden zu den angegebenen Zeiten zugegeben. Die Schwellung wurde mit Hilfe der Verteilung von [^{14}C]-Saccharose bestimmt. Alle offenen Symbole beziehen sich auf die Schwellung, die geschlossenen geben die Calciumaufnahme wieder. Die Zugaben erfolgten zu folgenden Zeitpunkten:
(○;●) 5 Minuten, (△;▲) 11.5 Minuten, (□;■) 18 Minuten.

schnelle Anteil der Abgabe so groß, daß fast das gesamte Calcium schnell abgegeben wird und die zweite langsame Abgabe vollständig verschwindet. Es kommt demnach mit zunehmender Vorinkubation in Gegenwart von Calcium und Abwesenheit von Phosphat zur Ausbildung eines zusätzlichen Pools mit schnell abgebbarem Calcium, wobei die Inkubation der energetisierten Mitochondrien in Gegenwart von Calcium offensichtlich die Umwandlung des ursprünglichen Pools mit

langsamer Calciumabgabe in den zweiten mit schneller Abgabe forciert (vgl. Abb.9, 10).

Mit zunehmender Vorinkubationszeit deuten sich dramatische Veränderungen an den Mitochondrien an. Sofort nach den Zugaben bei 11.5 Minuten schwellen sie sogar vollständig (Abb.11). Der nahezu parallele Verlauf von Calciumabgabe und Schwellungszunahme spricht dafür, daß die erste schnelle Abgabe von Calcium mit der dabei auftretenden Schwellung in einem direkten Zusammenhang steht. In Abb.12 wurde die schnelle Calciumabgabe mit der zugehörigen Schwellungszunahme verglichen. Die sehr gute Korrelation zwischen Calciumabgabe und Schwellung zeigt, daß die mit zunehmender Vorinkubationszeit immer größer werdende schnelle Abgabe von Calcium aus irreversibel geschädigten Mitochondrien kommt.

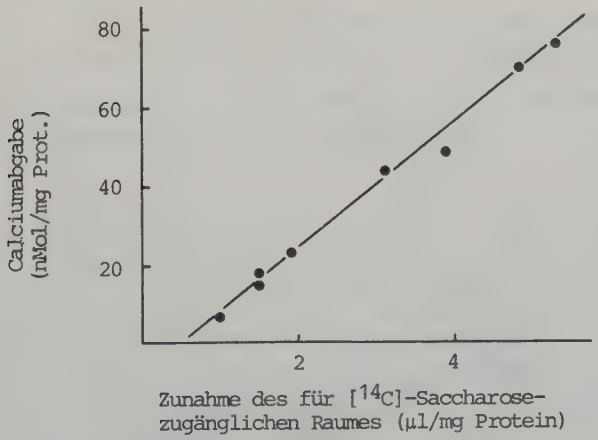


Abb.12: Korrelation zwischen Calciumabgabe und Schwellung

Die Inkubationsbedingungen waren wie in Abb.9. Die Ergebnisse stammen aus drei verschiedenen Mitochondrienpräparationen. Für die Berechnung der Schwellung und der dazugehörigen Calciumabgabe wurde wie folgt vorgegangen: Die abgegebene Calciummenge errechnete sich aus der Differenz der Calciumgehalte der Mitochondrien zum Zeitpunkt der Zugabe und zum Zeitpunkt, an dem die Schwellung ihr Plateau erreicht hatte (vgl.Abb. 11). Die Zunahme des Extramitochondrialraumes ergab sich aus der Differenz der Werte bei Erreichen des Plateau und zum Zeit-

punkt der Zugaben. Es wurde bewußt keine definierte Zeitspanne für die Auswertung gewählt, da je nach Mitochondrienpräparation die Endschwellung nach unterschiedlichen Zeiten erreicht wurde (vgl.Abb.9).

4.2.3. Schnelle Abgabe von Calcium nach Ruthenium Rot

Für eine genauere Analytik der schnellen Calciumabgabe nach Ruthenium Rot wurde die maximale Abgabegeschwindigkeit bei steigenden Calciumkonzentrationen untersucht, da eine Erhöhung der Calciumkonzentration analog der Verlängerung der Vorinkubationszeit bei gleicher Calciummenge zur Ausbildung des schnellen Calciumpools führt. Im Inkubationsansatz wurden steigende Mengen an Calcium vorgelegt und dann zum selben Zeitpunkt die Calciumabgabe initiiert.

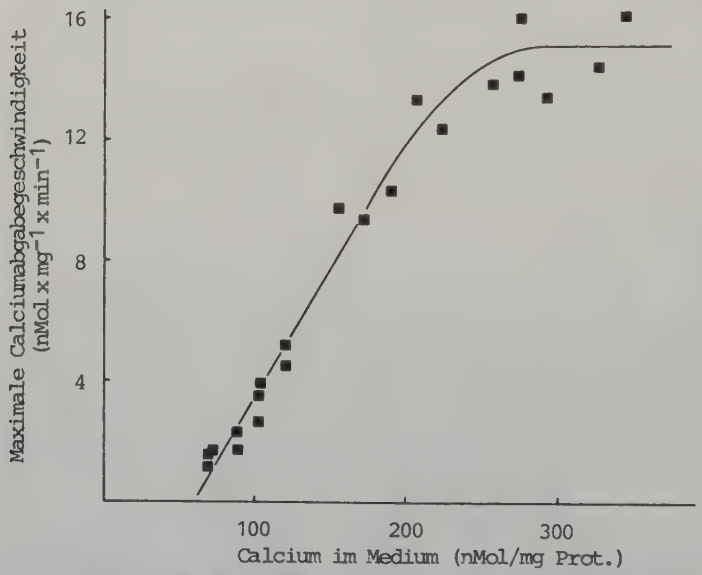


Abb.13: Schnelle Calciumabgabe aus Mitochondrien nach Ruthenium Rot

Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen von Abb.9; allerdings wurden hier steigende Mengen an Calcium angeboten. Die Zugaben erfolgten bei allen Proben gleichzeitig: Phosphat nach 10 Minuten und RR 15 Sekunden später. Die maximale Rate für die Calciumabgabe wurde errechnet aus dem arithmetischen Mittel der Calciumgehalte zu den Zeitpunkten 11 und 12.5 Minuten.

Mit steigendem Calciumangebot erhöht sich die aufgenommene Calciummenge, bis schließlich bei hohen Calciumkonzentrationen eine Sättigung eintritt, die unter den hier angegebenen Bedingungen der hohen Kaliumkonzentration sehr frühzeitig von schädigungsbedingtem Calciumefflux überlagert wird. In Abb.13 sind die Ergebnisse von vier Experimenten mit unterschiedlichen Mitochondrienpräparationen zusammengefaßt. Mit steigendem Calcium im Medium erhöht sich die maximale Abgaberate, solange wie durch Erhöhung des extramitochondrialen Calcium noch zusätzliches Calcium aufgenommen worden ist. Oberhalb von 250-300 nMol Ca^{2+}/mg Protein erreicht die maximale Abgabegeschwindigkeit ihr Maximum; eine weitere Steigerung der Calciumkonzentration im Medium führt bereits ohne Zugabe von Phosphat und RR zur schnellen Zerstörung der Mitochondrien und Caliumabgabe.

4.2.4. Langsame Calciumabgabe nach Ruthenium Rot

Zur Charakterisierung der zweiten langsamen Calciumabgabe nach Ruthenium Rot wurden energetisierte Mitochondrien mit steigenden Mengen an Calcium inkubiert.

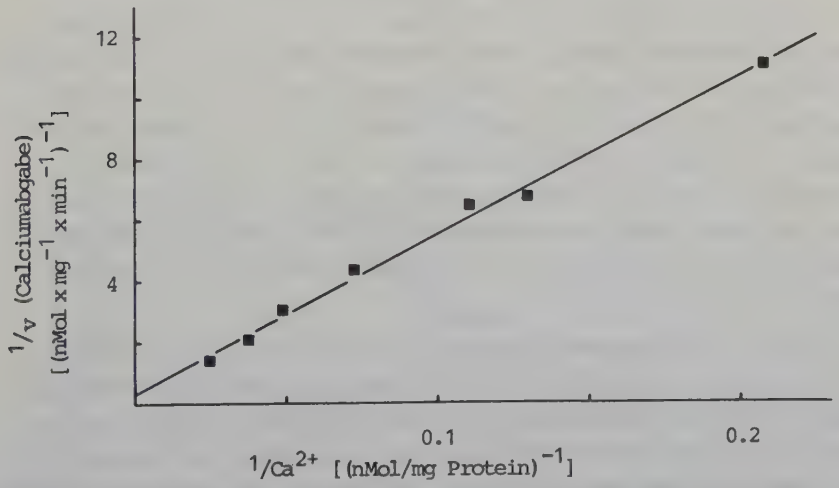


Abb.14: Langsame Calciumabgabe nach Gabe von Ruthenium Rot

Inkubationsbedingungen wie in Abb.11; die Zugaben von Phosphat (5 Min.) und RR (5.25 Min.) erfolgten allerdings bereits frühzeitig, um den Anteil an bereits geschädigten Mitochondrien kleinzuhalten. Die Abgaberate bei 38 Min. wurde gegen den Calciumgehalt der Mitochondrien nach 38 Min. aufgetragen. Bei der Berechnung der Gesamtcalciumgehalte wurde der Calciumgehalt nach der Präparation von 10.5 nMol/mg berücksichtigt.

Um den Anteil des ersten schnellen Abgabepools kleinzuhalten, wurde Phosphat und RR bereits nach 5 Minuten zugesetzt. Mit Hilfe der Auswertung nach Lineweaver-Burk wurde die Abgabegeschwindigkeit von Calcium zum Zeitpunkt 38 Minuten gegen den Calciumgehalt der Mitochondrien zum gleichen Zeitpunkt aufgetragen (Abb.14). Der Schnittpunkt mit der Ordinate ergibt ein V_{max} von 3.58 nMol/mg Protein x Minute. Die in der Literatur beschriebenen maximalen Abgaberaten nach RR, die über einen unabhängigen physiologischen Efflux verlaufen sollen, liegen im Bereich von 1 - 5 nMol Ca^{2+}/mg Protein x Minute [20,22,65]. Die hier beschriebene Calciumabgabe läuft ohne eine Schwellung ab (vgl. Abb. 11), d.h. die Mitochondrien bleiben während der Abgabe intakt.

4.2.5. Inhibierung der Phosphat-induzierten Calciumabgabe und Schwellung durch Ruthenium Rot

Die Phosphat-induzierte Schwellung und Calciumabgabe kann durch die rechtzeitige Zugabe von Ruthenium Rot (vgl.4.2.1.) noch verhindert werden, d.h. solange der Anteil an vorgeschädigten Mitochondrien noch klein ist. Aus diesem Grunde wurde in Abb.15 Phosphat und RR bereits nach 9.5 Minuten zugesetzt. Die Calciumkonzentration wurde so gewählt, daß per se noch keine Calciumabgabe bzw. nach Gabe von Phosphat im Verlaufe der Inkubation eine Calciumabgabe zu erwarten ist.

In parallelen Versuchsansätzen wurde das für [^{14}C]-Saccharose und das für [^{14}C]-Inulin-zugängliche Volumen bestimmt, da die Mitochondrienmembran im Verlaufe der Inkubation für Saccharose permeabel wird und die Berechnung der Matrix-Volumina damit unmöglich wird. In Abb.15a sind die aus der [^{14}C]-Saccharose- bzw. [^{14}C]-Inulin-Verteilung berechneten

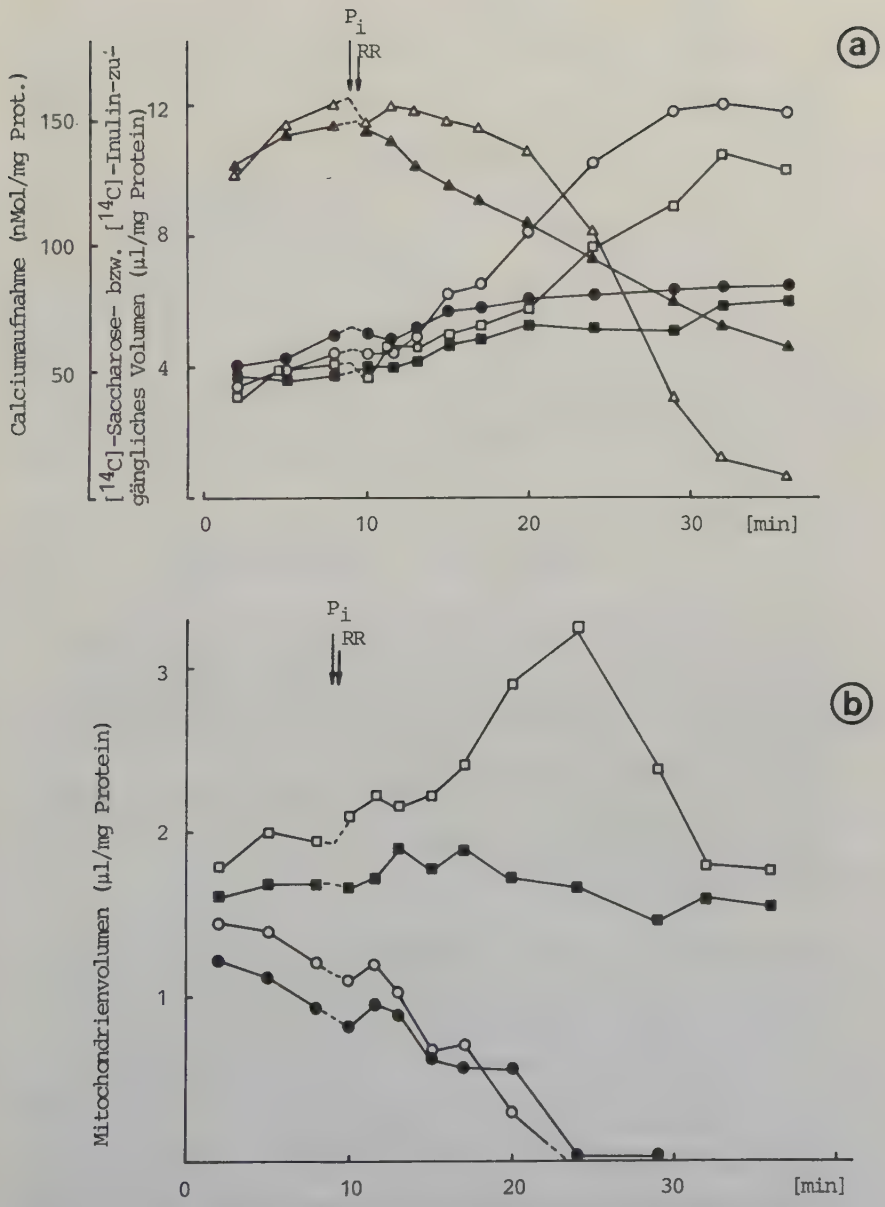
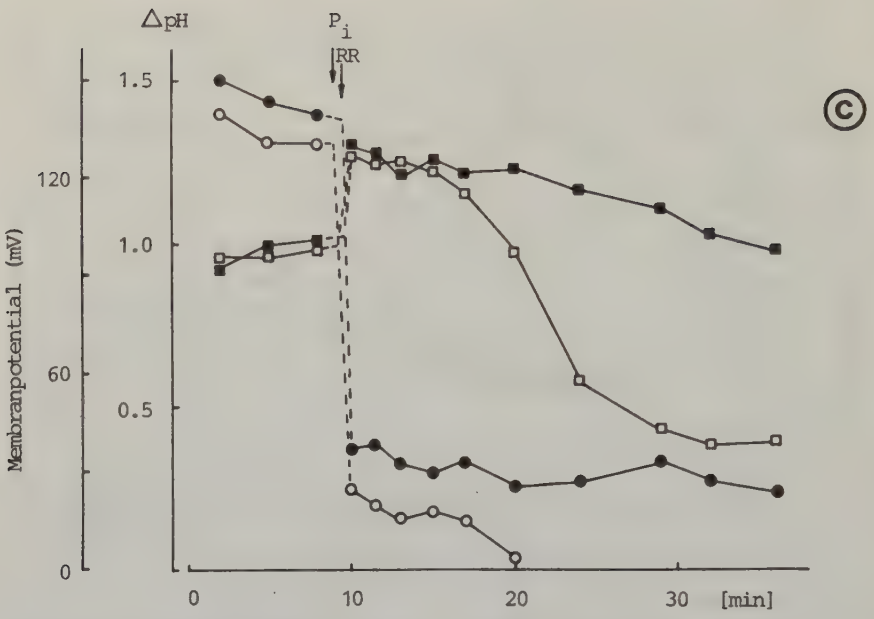


Abb.15: Mitochondriale Volumina und Energieparameter bei der Inhibierung der Phosphat-induzierten Calciumabgabe durch Ruthenium Rot



Die Inkubationsbedingungen waren wie in Abb.7, die Calciumkonzentration war 0.185 mM. Für die Ermittlung der Schwellung über [^{14}C]-Saccharose und [^{14}C]-Inulin war ein dritter paralleler Inkubationsansatz c notwendig; die Radionuklide wurden analog Abb.1 eingesetzt. Alle ausgefüllten Symbole beziehen sich auf Inkubationen mit RR, die offenen Symbole repräsentieren solche ohne RR.

a) Calcium und Extramitochondrialvolumina
   Calcium (△;▲); Schwellung: Saccharose (○;●); Inulin (□;■)
b) Mitochondrienvolumina
   Saccharose: (○;●); Inulin (□;■)
c) Membranpotential und ΔpH
   ΔpH (○;●); MP (□;■)

Extramitochondrialvolumina aufgetragen: Unterschiede sind sowohl im Ausmaß als auch im Beginn einer Zunahme zu beobachten, wobei bei Berechnung über [^{14}C]-Inulin diese später und mit einem geringeren Ausmaß auftritt. Noch sehr viel dramatischer manifestieren sich die Unterschiede bei der Berechnung von Matrixvolumina (Abb.13b). Nur zu Beginn der Inkubation unterscheiden sich die Volumina nicht. Während die mit Hilfe von [^{14}C]-Saccharose ermittelten Mitochondrienvolumina - auch in Gegenwart von RR - immer kleiner werden, bleiben die auf der Grundlage der [^{14}C]-Inulin-Ver-

teilung berechneten Volumina konstant und zeigen nach Phosphatgabe sogar korrekt eine Schwellung an (Abb.15b).

Membranpotential und ΔpH (Abb.15c) wurden mit Hilfe der Volumina, die sich aus der [^{14}C]-Inulin-Verteilung ergaben, errechnet. Nach Zugabe von Phosphat bzw. Phosphat und RR steigt das Membranpotential an; RR schützt die Mitochondrien vor einer Deenergetisierung, welche bei Inkubation ohne RR (Abb.15c) nach einer Lag-Phase einsetzt. Bei etwa halbmaximaler Schwellung tritt als letztes Ereignis in der Kette bis zur irreversiblen Zerstörung der Mitochondrien die Calciumabgabe ein (Abb.15a). Bei der Gabe von RR kommt es dagegen nur zu einer langsamen stetigen Abgabe von Calcium. ΔpH und Membranpotential bleiben erhalten.

4.3. Calciumaufnahme bei Mitochondrien: Wird Calcium wirklich osmotisch aktiv aufgenommen ?

Die Verteilung von monovalenten Kationen über die Mitochondrienmembran in Gegenwart eines Ionophors, der einen elektrogenen Transfer zuläßt, gehorcht einer Gleichgewichtsverteilung, bei der der Konzentrationsgradient mit dem Membranpotential im Gleichgewicht steht [81]. Deshalb müßte ein Vergleich der Verteilung von Rubidium - in Gegenwart von Valinomycin - und von Calcium eine Abschätzung der Beziehung zwischen Membranpotential und Calciumverteilung erlauben. Rottenberg und Scarpa [63] untersuchten den Calciumgradienten an Mitochondrien unter dem Einfluß von Entkopplern und Ionophoren und verglichen ihn mit dem Rubidium-Gradienten. Um die Bindung und interne Präzipitation von akkumuliertem Calcium zu reduzieren, wurden ihre Experimente in Gegenwart von Acetat durchgeführt. Die gefundene Verteilung gehorchte der Gleichung:

$$\log ([Ca^{2+}]_{in} / [Ca^{2+}]_{au}) = 2 \log ([Rb^{+}]_{in} / [Rb^{+}]_{au})$$

Danach wurde also die Calciumaufnahme in Mitochondrien durch das Membranpotential getrieben mit einem Nettoladungstransfer von 2 über einen elektrogenen Prozess.

ESR-Studien mit Mn^{2+}-Akkumulation in Mitochondrien ergaben einen Aktivitätskoeffizienten für Matrix-Mn^{2+} von 0.017 - 0.32 abhängig von der Konzentration der angebotenen schwachen Säure [47]. Für Calcium ergaben die Untersuchungen von Azzone et al. [64] höhere Aktivitätskoeffizienten. Diese Autoren schlossen aufgrund der in Gegenwart von Acetat auftretenden Schwellung auf osmotisch vollaktives Calcium. Nicholls [22] fand, daß Membranpotential und Calciumverteilung dann einander entsprachen, wenn er einen Aktivitätskoeffizienten von 0.1 annahm. Die Experimente von Krell et al. [76] dagegen zeigen, daß die mit der Calciumaufnahme verbundenen Volumenänderungen allein mit der Abgabe monovalenter Kationen zu erklären sind und die gleichzeitige Calciumaufnahme osmotisch still verläuft.

Da die Experimente von Rottenberg und Scarpa [63] grundlegend waren für die Etablierung der Calciumaufnahme über einen elektrogenen Prozeß (Uniporter) und der Verteilung von Calcium nach dem Membranpotential, wurden sie unter Originalbedingungen (d.h. 1 mM Acetat und 1 bzw. 5 mM K^+) mit Hilfe der in dieser Arbeit angewandten Methoden nachgeprüft. Da in allen Experimenten dieser Dissertation, in denen ein Δ pH bestimmt wurde, 90 µM Natriumacetat zugegen war, wurde eine Kontrolle mit dieser Konzentration als Vergleich mitgemessen. Um die gemessenen Volumenänderungen mit den entsprechenden Ionenbewegungen korrelieren zu können, wurde von einer Isotonie von 300 m Osmol/l ausgegangen. In Tabelle 4 sind die Resultate zusammengefaßt. In der linken Spalte mit nur 90 µM Acetat halten sich Volumenreduktion (0.59 µl/mg = 177 nOsmol/µl) und Ionenabgabe bzw. -aufnahme (Kationenabgabe 177 nMol und Acetataufnahme von 4 nMol) die Waage, d.h. die Schrumpfung der Mitochondrienmatrix läßt sich vollständig durch die Nettoabgabe von einwertigen Ionen erklären. Die dabei aufgenommenen 150 nMol Calcium/mg Protein können deshalb nur osmotisch inaktiv in der Matrix vorliegen. Weiter bedeutet dies, daß die Grundvoraussetzung - Calcium verteile sich über die

Membran nach dem elektrochemischen Potential [59,63] - unter den untersuchten Bedingungen nicht erfüllt ist.

Gegen eine osmotisch aktive Aufnahme von Calcium in Gegenwart von Acetat sprechen auch die Ergebnisse in den restlichen Spalten (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zur Frage der osmotisch aktiven Calciumaufnahme unter den Versuchsbedingungen von Rottenberg und Scarpa [63].

Mitochondrien (2.5 mg/ml) wurden im Medium (200 mM Saccharose, 10 mM Mops pH 7.2, 3 mM $MgCl_2$, 0.5 µg/ml Valinomycin, 1 mM Natriumacetat und 1 bzw. 5 mM KCl) inkubiert. Die Zugaben waren: 1 µM Rotenon und 5 mM Succinat bei Versuchsbeginn, 160 nMol Calcium/mg nach 5 Minuten. In der Tabelle sind jeweils die Mittelwerte der verschiedenen Parameter vor bzw. nach Calciumzugabe aufgetragen. Der endogene Kaliumgehalt betrug 115 nMol/mg (287 µM K^+).

Kalium (mM)		1.287	1.287	5.287
Acetat (mM)		0.090	1.000	1.000
Calciumaufnahme (nMol/mg Protein)		150	148	142
Matrixvolumen	$-Ca^{2+}$	2.68	2.83	2.33
(µl/mg Protein)	$+Ca^{2+}$	2.09	2.38	1.94
Volumenreduktion ΔV nach Ca^{2+} (µl/mg Protein)		0.59	0.45	0.39
nOsmol/µl aus ΔV bei Isotonie = 300 mOsmol/l		177	135	117
Acetataufnahme nach Ca^{2+} (nMol/mg Protein)		4	37	79
Monovalente Kationen	$-Ca^{2+}$	320	340	423
(nMol/mg Protein)	$+Ca^{2+}$	143	168	239
Kationenabgabe ΔX^+ (nMol/mg Protein)		177	172	184

Die Summe aus Kationenabgabe und Acetataufnahme entsprechen bei 1 mM K^+ und bei 5 mM K^+ der dabei auftretenden Volumenreduktion der Mitochondrien; das dabei aufgenommene Calcium (148/142 nMol/mg Protein) kann folglich nur osmotisch in-

aktiv aufgenommen und in der Matrix gebunden vorliegen. Bei allen Betrachtungen bleiben mögliche Protonenbewegungen unberücksichtigt, da Protonenverschiebungen zwar stattfinden (ΔpH-Anstieg), aber wegen der Puffersysteme osmotisch nicht in Erscheinung treten [76].

5. DISKUSSION

5.1. Die Calciumabgabe nach Phosphat

5.1.1. Einfluß von Phosphat, Acetoacetat und pH auf die Calcium-abhängige Calciumabgabe

Isolierte Mitochondrien können bei hoher K^+-Permeation spontan ihr Calcium abgeben, wobei die Abgabekinetik von der Menge an angebotenem Calcium abhängt. Die Voraussetzung für diese Calciumabgabe ist eine hohe Permeabilität für Kalium [76]. Einer Abgabe gehen immer Schwellung der Mitochondrien und Abfall im Membranpotential voran.

Das Einsetzen der Calciumabgabe ist in doppelter Hinsicht zeitabhängig. Einmal treten die destruktiven Prozesse nach Calcium- und Phosphatgabe mit einer von der Vorgeschichte der Mitochondrien abhängigen unterschiedlichen Verzögerung ein. Zum zweiten hängt bei einer gegebenen Mitochondrienpräparation die Zeitspanne zwischen Phosphatgabe und Calciumabgabe von der Dauer der Vorinkubation unter Atmungshemmung in Gegenwart von Calcium ab. Die Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit spricht für einen zeitabhängigen Prozess, bei dem Calcium selbst mitwirkt, die Speicherkapazität der Mitochondrien für Calcium zu vermindern. Man kann diese Veränderungen als übereinstimmend mit denen von Haworth und Hunter [57,58] beschriebenen "Calcium-induced membrane transition" interpretieren (Tabelle 2). Die Fähigkeit von Mitochondrien, Calcium zu speichern, nimmt mit fallendem pH ab. Phosphat zeigt abhängig vom pH einen gegenläufigen Einfluß auf die Calciumabgabe. Bei niedrigem pH und Vorinkubation in Gegenwart von Calcium beschleunigt Phosphat die destruktive Calciumabgabe (Abb.4). Da sowohl Phosphat als auch ein niedriger pH im Medium zu einer Absenkung des intramitochondrialen pH führen und damit Protonen liefern für eine Konkurrenz um interne Calciumbindungsstellen [82], ist ein gemeinsamer Mechanismus für die Calciumabgabe wahrscheinlich. Bei hohem pH dagegen kann

Phosphat, sofern es zu Beginn der Vorinkubation zugegeben wird, die Calcium-induzierten Veränderungen verhindern. Phosphat erniedrigt die freie Calciumkonzentration in der Matrix durch die Ausbildung eines unlöslichen Calciumphosphatkomplexes [83,84]. Diese Erklärung deckt sich auch mit dem Befund, daß mitochondriales Phosphat den RR-induzierten Efflux von Calcium inhibiert [84].

Der je nach Versuchsbedingung unterschiedliche Einfluß von Phosphat auf die destruktiven Vorgänge bei der Calciumabgabe spiegelt sich auch in seiner Wirkung auf die Acetoacetat-induzierte Calciumabgabe wieder. Acetoacetat stimuliert die Abgabe, indem es die Pyridinnukleotide oxidiert [40,85]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß für die Induktion der Calciumabgabe bei pH 7.6 im Vergleich mit pH 6.8 eine höhere Calciumbeladung notwendig ist (Tabelle 1). Protonen beeinflussen die Reaktion von Acetoacetat mit Pyridinnukleotiden:

$$\text{Acetoacetat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \beta\text{-Hydroxybutyrat} + \text{NAD}^+$$

und verschieben das Gleichgewicht in Richtung Oxidation. Da Phosphat die Matrix ansäuert, ist eine Steigerung der Acetoacetat-induzierten Calciumabgabe durch Phosphat zu erwarten. Andererseits muß der Calciumgehalt in den Mitochondrien erst einen kritischen Wert erreichen, damit Acetoacetat die destruktiven Prozesse einleiten kann. Wie bereits geschildert, bindet Phosphat bei hohem pH Calcium und kann somit den Einfluß von Acetoacetat auf die Calciumabgabe verhindern.

5.1.2. Calcium-induzierte Veränderungen an der Mitochondrienmembran

Die Calcium-induzierte Calciumabgabe wird erleichtert durch hohe Permeation für Kalium [76]; sie kann vermindert werden durch Erhöhung der Mg^{2+}-Konzentration im Medium. Ein direkter Einfluß von Mg^{2+} auf die Membran kann nicht ausgeschlossen werden, da es den K^+-Transport und die Membranfluidität

verändert [86]. Die Calcium-induzierten Änderungen an den Mitochondrien waren am ausgeprägtesten, wenn atmungsgehemmte nichtenergetisierte Mitochondrien in Abwesenheit von Phosphat mit Calicum konfrontiert wurden. Man kann deshalb davon ausgehen, daß nicht das Calcium an sich, sondern nur der Anteil von Calcium, der nicht durch Phosphat oder energieabhängig gebunden ist, für die Veränderungen an der Mitochondrienmembran verantworltich gemacht werden muß. In den aufgezeigten Experimenten wurde die Calciumabgabe gesteigert durch hohe Calciumkonzentrationen, durch niedrigen pH, durch die Anwesenheit von Phosphat und Acetoacetat bei niedrigem pH und durch Calciumcycling. Dagegen wurde die Abgabe von Calcium verhindert durch hohes pH, durch Phosphat bei hohem pH und durch Inhibition der Calciumwiederaufnahme mittels RR oder EGTA. Vereinfacht ausgedrückt bedeutet dies: Bedingungen, die zu einer hohen intramitochondrialen Bindungskapazität führen, schützen die Mitochondrien vor einer Calcium-induzierten Calciumabgabe.

In der Literatur herrscht bei der Beurteilung von zeitabhängigen Veränderungen an Mitochondrien, die mit einer spontanen Calciumabgabe verknüpft sind, eine beträchtliche Konfusion. Verschiedene experimentelle Bedingungen wurden aufgezeigt, unter denen ein unabhängiger Abgabeweg für Calcium aktiviert werden soll: Die Verschiebung des Redoxstatus von Pyridinnukleotiden in Richtung auf Oxidation [42,87,88], die Behandlung mit polyungesättigten Fettsäuren [45] und die Gabe von Phosphat [89,90]. Diese spontane Calciumabgabe trat vor allem dann auf, wenn Mitochondrien in Gegenwart von Phosphat und Abwesenheit von Mg^{2+} und Adeninnukleotiden Calcium aufgenommen hatten [3,10,34]. Obwohl diese Art von Abgabe in vivo nicht auftreten sollte [34], so sind doch Studien der dabei auftretenden Ergebnisse von Nutzen für die Aufklärung von physiologisch relevanten Mechanismen der Calciumregulation. Nach der chemiosmotischen Theorie müßte die Schädigung der Mitochondrienmembran das Membranpotential abfallen lassen unter gleichzeitiger Calciumabgabe über eine Umkehr des Uniporter. Die Abgabe von Phosphat wird dann parallel zur Calciumabgabe

verlaufen, da die freie Matrixkonzentration von Phosphat als Folge der Dissoziation des Calciumphosphatkomplexes ansteigt [84]. In diesem Zusammenhang erscheinen die Untersuchungen von Roos et al. [30], daß unter Erhalt von $\Delta\psi$ Calcium - und Phosphatabgabe asynchron verlaufen, etwas rätselhaft. Zoccarato und Nicholls [84] konnten zeigen, daß die spontane Calciumabgabe in Abhängigkeit von der Zeit immer größer wird. Parallel dazu kommt es zur Abgabe von Phosphat und Deenergetisierung. In Gegenwart von Mg^{2+} und ATP dagegen bleibt der nach RR-Gabe sichtbare Calciumefflux unabhängig von der Vorinkubationsdauer immer gleich schnell [84]. Es spricht vieles dafür, daß der Zusatz von Mg^{2+} und ATP ins Medium für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich ist (vgl.30 und 84). Dabei ist zu beachten, daß ein Mg^{2+}-Influx bei Mitochondrien millimolare Konzentrationen von Magnesium im Medium voraussetzt [91,92]. Während Crompton et al. [91] auch nach Abgabe von über 60% des gesamten mitochondrialen Magnesiums noch keine strukturellen Änderungen an den Mitochondrien feststellten, sprechen andere Untersuchungen sehr wohl für Veränderungen an der Mitochondrienmembran [93]. Phosphat stimuliere danach die Mg^{2+}-Abgabe, während EGTA oder RR inhibierten. Phosphat soll gemeinsam mit dem endogenen Calcium auf die Membranstruktur Einfluß nehmen [93], während externes Calcium und Phosphat zu einem gemeinsamen Efflux von Mg^{2+} und Adeninnukleotiden führen [37]. In beiden Fällen ändert sich die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran; als Folge tritt ein erhöhter Calciumefflux auf. Die Mitochondrien regulieren gegen mit gesteigerter Atmung aufgrund der stark erhöhten Zyklisierung von Calcium [37]. Für einen gekoppelten und synchronen Verlauf von Calcium- und Phosphatbewegungen sprechen die Untersuchungen von Rugolo et al. [29], wobei der Transport der beiden Ionen direkt mit dem Redoxstatus von membrangebundenen SH-Gruppen zusammenhängt.

Die destruktiven Änderungen durch Calcium und Phosphat können durch Zugabe von Rinderserumalbumin verhindert und durch freie Fettsäuren gesteigert werden [94]. Die Aktivierung von

Phospholipasen durch Calcium wurde auch für die Schwellung von Mitochondrien in Gegenwart von N-Äthylmaleinimid verantwortlich gemacht [95]. In diesem Zusammenhang ist durchaus vorstellbar, daß es während der Alterung von Mitochondrien zur Aktivierung der Phospholipase A_2 kommen kann [96].

Versucht man die Flut von Untersuchungen und Informationen auf einen einfachen gemeinsamen Nenner zu bringen, so ergibt sich das folgende Bild: Kandidaten für die Initiation von Ereignissen mit so katastrophalen Folgen für die Mitochondrien sind immer wieder das Calcium selber und Phosphat. Als charakteristische Anzeichen für den Beginn der Mitochondrienzerstörung gelten Permeabilisierung der Membran und Schwellung, Deenergetisierung, Mg^{2+}- und Adeninnukleotidabgabe, Oxidation von Pyridinnukleotiden bzw. membranständigen SH-Gruppen. Die Ergebnisse dieser Dissertation reihen sich sehr gut ein in die Vorstellungen über die destruktive Calciumabgabe. Vor allem das intramitochondriale Calcium, welches weder durch Phosphat noch andere energieabhängige Bindungsstellen weggebunden wird, scheint direkt oder indirekt an der Auslösung der Mitochondrienzerstörung beteiligt zu sein. Die Beurteilung allerdings ob Calcium direkt z.B. durch Bindung an die Membran oder mittelbar beteiligt ist, ist beim gegenwärtigen Informationsstand nicht möglich.

5.2. Die Calciumabgabe nach Ruthenium Rot-Gabe

Phosphat kann zu einer Calciumabgabe verbunden mit Permeabilisierung und Schwellung der Mitochondrien führen. Je länger man in Gegenwart von Calcium ohne Phosphat vorinkubiert, desto schneller setzt die Calciumabgabe nach Phosphatzusatz ein. In den Experimenten mit RR sollte untersucht werden, ob und unter welchen Voraussetzungen RR die Mitochondrien vor ihrer Zerstörung schützen kann.

Die Abgabe von Calcium aus Mitochondrien nach Phosphat und anschließendem RR-Zusatz zeigte einen biphasischen Verlauf. Der zweite langsamere und konstante Teil der Abgabe dürfte dem in der Literatur [22,65] beschriebenen Abgabe-

weg mit einem V_{max} von 1-5 nMol Ca^{2+}/mg x min entsprechen. Diese erfolgte ohne Schwellung der Mitochondrien; bei kurzer bzw. ohne Vorinkubation machte sie den Hauptanteil des biphasischen Effluxes aus. Daneben trat mit zunehmender Vorinkubation in Gegenwart von Calcium eine weitere schnelle Abgabe ein. Sie überlagert sich der langsamen "physiologischen" Abgabe und ist mit einer Schwellung und Zerstörung der Mitochondrien verbunden. In Abhängigkeit von der Vorinkubation scheint sich dabei der Pool mit langsamer Abgaberate (intakte Mitochondrien) in einen mit schneller Abgabe (geschwollene, zerstörte Mitochondrien) umzuwandeln (Abb.11). Auffallend ist, daß RR nur dann die vollständige Abgabe von Calcium und Zerstörung der Mitochondrien verhindern kann, wenn die Calciumabgabe nicht unmittelbar nach der Phosphatzugabe einsetzt. Die schnelle Abgabe von Calcium ist eindeutig eine Folge der Zerstörung von Mitochondrien, da die Zunahme im Volumen (Schwellung) mit der abgegebenen Calciummenge korreliert. Gibt man Phosphat von Anfang an bzw. nach nur kurzer Vorinkubation und hält damit die Vorinkubationszeit in Gegenwart von Calcium klein, dann tritt eine schnelle Calciumabgabe nach RR nicht auf; der Anteil an geschädigten Mitochondrien ist offensichtlich noch klein. Inkubiert man dagegen Mitochondrien ohne Calcium vor und setzt analoge Mengen an Calcium unmittelbar vor der Zugabe von Phosphat und RR zu, so ergab sich in Abhängigkeit von der Vorinkubationsdauer ein völlig verändertes Bild. In Kontrollansätzen, denen nur Phosphat zugesetzt wurde, trat innerhalb der Versuchsdauer keine Calciumabgabe auf (Abb. 9 , 10). Dieses Ergebnis deckt sich exakt mit den Untersuchungen aus Abb.7. Dort wurde gezeigt, daß gleichzeitige Gabe von Phosphat und Calcium nicht zu einer Stimulierung sondern Inhibierung der Phosphat-induzierten Calciumabgabe führte. Da die Zugaben zu verschiedenen Zeiten erfolgten, ergibt sich ein weiterer zwingender Schluß: Die Vorinkubation von moderater Dauer in Abwesenheit von Calcium schadet energetisierten Mitochondrien nicht. Die nichtgeschädigten Mitochondrien zeigen bei anschließender Gabe von RR nur die langsame Abgabe. Abb.9b bestätigt dies eindrucksvoll.

Trotz steigender Vorinkubationszeit - in Abwesenheit von Calcium - bis zu 20 min ergibt sich für alle Inkubationen die gleiche einphasische Abgabe.

Die Resultate aus den Abbildungen 9a und 9b zeigen eindeutig, daß weitere Inkubation von energetisierten Mitochondrien in Gegenwart von Calcium diese zeitabhängig derart vorschädigt, daß ein zunehmender Anteil von ihnen für eine Phosphat-induzierte schnelle Calciumabgabe empfindlich wird. Für die Permeabilisierung und Schwellung der Mitochondrien ist Phosphat unbedingt erforderlich neben der Vorinkubation mit Calcium und ohne Phosphat. Es spricht vieles dafür, daß das intramitochondriale freie Calcium am Sensibilisierungsprozess ursächlich beteiligt ist. In vielen Arbeiten wird als Hauptgrund für die Deenergetisierung und Zerstörung von Mitochondrien ein erhöhtes Calciumcycling und damit ein quasi Totlaufen der Mitochondrien impliziert. Durch die Gabe von RR werde die Calciumzyklisierung unterbunden; die Mitochondrien würden so vor dem "futile cycle" geschützt. Messungen an der Sauerstoffelektrode ergaben allerdings, daß die Mitochondrien nach Phosphat keinesfalls eine gesteigerte Atmung zeigen. Wahrscheinlich ist vielmehr, daß durch die Gabe von RR die Rückaufnahme von abgegebenem Calcium verhindert und so die intramitochondriale freie Calciumkonzentration kleingehalten wird. Damit kann Calcium seine "zerstörerische Wirkung" auf die Mitochondrienmembran nicht ausüben.

In den bisher diskutierten Experimenten wurde gezeigt, daß die Phosphat-induzierte Calciumabgabe nach RR sich aus zwei Pools zusammensetzt. Während die erste Abgabe aus deenergetisierten entkoppelten Mitochondrien erfolgt, verläuft die zweite langsame Abgabe ohne Schwellung der Mitochondrien und diese bleiben auch während der Calciumabgabe intakt und energetisiert. Abb.15 beweist eindeutig, daß RR-Gabe kurz nach Phosphatzusatz energetisierte Mitochondrien vor ihrer Zerstörung schützt. Interessant ist, in welcher Reihenfolge bei der Kontrolle ohne RR bestimmte

Ereignisse auftreten. Schon kurz nach der Phosphatgabe ist eine Zunahme im Extramitochondrialvolumen (Schwellung) zu sehen, das Matrixvolumen steigt ebenfalls. Die Mitochondrien deenergetisieren, das Δ pH geht gegen Null und schließlich setzten bei ungefähr halbmaximaler Schwellung Calcium- und Phosphatabgabe ein.

Es ist lange bekannt, daß die Zugabe von einem Entkoppler zu Mitochondrien zu einem $\Delta\psi$-Abfall und zur Calciumabgabe führt [10,23,34,50]. In dieser Abgabe wird eine Umkehr des Uniporters gesehen [34,53]. Da RR ein potenter Inhibitor der Calciumaufnahme über den Uniporter ist, müßte ein Efflux von Calcium über diesen Weg durch RR blockierbar sein. In der Literatur allerdings herrscht Unklarheit über die Wirkung von RR auf die Entkoppler-induzierte Calciumabgabe bei Mitochondrien. Manche fanden kein Ansprechen auf RR (47,49] andere eine partielle Sensibilität [53] und wiederum andere eine Hemmung durch RR [97]. Die unvollständige Hemmung der Calciumabgabe durch RR wurde oft als Indiz dafür genommen, daß in entkoppelten Mitochondrien ein weiterer Abgabeweg für Calcium z.B. ein H^+/Ca^{2+}-Austausch auftritt [54]. Man kann diese Ergebnisse allerdings auch durch Änderungen des Uniporters [53,55] oder durch unspezifische Änderungen der Membranpermeabilität erklären [34, 36,58].

Nach Jurkowitz et al. [56] erfolgt die Abgabe von akkumuliertem Calcium aus Mitochondrien nach Zugabe von Entkoppler nicht nur durch Umkehr des RR-sensitiven Uniporters, sondern auch über einen mehr oder weniger spezifischen Weg, der nach Adeninnukleotid-Depletion bzw. Oxidation von mitochondrialem NAD(P)H sichtbar wird. Die Abgaberate der RR-insensitiven Calciumabgabe hängt direkt mit dem endogenen Adeninnukleotid-Spiegel zusammen [56]. Die Abgabe von Calcium wird begleitet von einer Schwellung und Mg^{2+}-Abgabe [98], beides Anzeichen für unspezifische Änderungen in der Membranpermeabilität. Nicholls

et al. [34,40] konnten zeigen, daß hohe Calciumspiegel in Gegenwart von Phosphat drastische Änderungen an den Mitochondrien verursachen, charakterisiert durch Schwellung und Verlust von endogenen Komponenten [36,38,57,58,94,99]. Acetoacetat und andere sogenannte "Ca^{2+}-releasing"-Substanzen verstärken diese Vorgänge, während Adeninnukleotide und Oligomycin die Membran stabilisieren sollen [34]. Die Bedingungen für die Ausbildung der RR-insensitiven Calicumabgabe nach Entkoppler korrelieren mit jenen von Haworth und Hunter [57,58,94] mit unspezifischen Änderungen in der Permeabilität der Mitochondrienmembran. Pfeiffer et al. [36, 38] untersuchten Substanzen, die Mitochondrien unter Änderung ihrer Permeabilität zu einer Calciumabgabe veranlassen. Die Ursache hierfür sahen sie in einer Interferenz mit der Reacylierung von Lysophosphatiden, welche durch Ca^{2+}-abhängige Phospholipasen A_2 produziert wurden. Die Untersuchungen von Jurkowitz et al. [56] schließen eine Beteiligung von Phospholipasen nicht aus, da die Calciumabgabe vom Calciumgehalt abhängt und auf Nupercain (Phospholipasehemmer) anspricht.

5.3. Zur Frage der osmotischen Aufnahme von Calcium

Bereits 1965 wurde der erste Versuch unternommen, den Mechanismus der Calciumaufnahme mit Hilfe der Theorie der sogenannten chemischen Kopplung zu erklären [100]. Mit der Einführung und Verbreitung der chemiosmotischen Theorie [101] wurde dann rasch eine Verbindung zwischen Energietransduktion und Calciumaufnahme hergestellt. 1970 schließlich fanden zwei Gruppen, daß die Calciumaufnahme - ohne Atmung bzw. ATP-Gabe - möglich ist unter Ausnutzung eines Diffusionspotentials, welches durch Gabe von Entkoppler, durch das permeable Anion Thiocyanat oder durch Kalium in Gegenwart von Valinomycin gebildet worden sein kann [102,103]: Die Aufnahme von Calcium mußte deshalb ein elektrophoretischer Prozess sein. Fest etablieren konnte sich diese Vorstellung mit der Arbeit von Rottenberg und Scarpa [63].

Sie verglichen die Verteilung von Calcium zwischen energetisierten Mitochondrien und dem Medium mit der Rubidium-Verteilung, wobei sich Rb^+ in Gegenwart von Valinomycin entsprechend dem Membranpotential verteilt. Ihre Untersuchungen ergaben, daß die Verteilung von Calcium (in Gegenwart von Acetat) vom Membranpotential bestimmt wird, wobei Calcium mit einer Nettoladung von 2 aufgenommen wird. Heaton und Nicholls [60] arbeiteten ebenfalls mit der Technik der Rb^+-Verteilung; sie verglichen den Calciumtransport über die innere Mitochondrienmembran mit dem Ca^{2+} elektrochemischen Gradienten des Ca^{2+}, $\Delta\mu Ca^{2+}$. Während ihre Ergebnisse die Möglichkeit einer Calciumaufnahme über einen Ca^{2+}/H^+-Antiporter ausschlossen, ergab sich für die Aufnahme über einen Ca^{2+}-Uniportmechanismus nahezu Übereinstimmung zwischen gemessener und errechneter Calciumverteilung.

Azzone et al. [64] untersuchten in Gegenwart von 10 mM Acetat Volumenänderungen der Mitochondrienmatrix in Abhängigkeit von der Calciumaufnahme. Unter Annahme eines Aktivitätskoeffizienten von 1 ermittelten sie aus der gesamten aufgenommenen Calciummenge die freie mitochondriale Calciumkonzentration und fanden diese übereinstimmend mit derjenigen freien Calciumkonzentration, die sie auf der Grundlage der gemessenen Volumenänderungen und damit verbundener osmotisch aktiver Calciumacetat-Aufnahme berechnet hatten.

Ein Hauptproblem bei den oben erwähnten Experimenten ist die Frage nach der aktuellen Ca^{2+}-Aktivität in der Mitochondrienmatrix. Permeable Anionen wie z.B. Acetat bringen zwar H^+ in die Matrix und könnten damit die Bindung von Calcium oder seine Ausfällung vermindern [60,63], ein gewisser Anteil liegt aber sicherlich, abhängig von den experimentellen Bedingungen [104], gebunden vor. Aus diesem Grunde sind alle Daten über eine Calciumverteilung, auch in Gegenwart von Acetat, nicht absolut quantitativ.

Die Problematik des Transfers von Ladungen während der Calciumaufnahme wurde von Crompton und Heid wiederaufgegriffen [105]. Bei ihrer Methode waren keinerlei Annahmen über das Ausmaß der Calciumbindung in der Matrix notwendig. Sie bestimmten diejenige extramitochondriale freie Calciumkonzentration, die erforderlich war, um eine konstante freie Calciumkonzentration im Mitochondrium zu erhalten, wobei das Membranpotential mittels Entkoppler variiert wurde. Ihre Werte für den Ladungstransfer von 1.8 - 2.1 sind deshalb von besonderem Interesse, weil sie unter experimentellen Bedingungen erhalten wurden, bei denen die Problematik einer Bindung oder Präzipitation von Calcium ausgeschaltet wurde: Calcium wird danach eindeutig über einen elektrophoretischen Uniport mit der Ladung 2 aufgenommen [105]. Da diese Untersuchungen die früheren Arbeiten [60,63] so eindrucksvoll bestätigen, meint auch Carafoli [50] noch 1982, daß beim gegenwärtigen Wissensstand alles für einen reinen elektrophoretischen Uniport spräche. Diese Sicht der Dinge war die Grundvoraussetzung für die Entwicklung des Konzeptes von unabhängigem Ca^{2+}-Influx und -Efflux.

Da im Rahmen dieser Dissertation der Frage nach einem unabhängigen Calciumefflux - sichtbar nach Ruthenium Rot - nachgegangen worden war und beim Studium der Literatur einige Zweifel an der Richtigkeit der Vorstellungen bei der Calciumaufnahme auftraten, interessierte noch die Überprüfung der Grundvoraussetzung aller zuvor diskutierten Untersuchungen: Kann Calcium in der Matrix wirklich mit einem Aktivitätskoeffizienten von 1 vorliegen ? Dazu wurden die Standardbedingungen mit jenen von Rottenberg und Scarpa [63] verglichen.

Die in 4.3. aufgezeigten Ergebnisse demonstrieren eindeutig, daß selbst unter Bedingungen einer hohen intramitochondrialen Acetatkonzentration ein Großteil des zuvor aufgenommenen Calciums osmotisch nicht aktiv vorliegen kann. Wir können die mit der Calciumaufnahme verbundenen Volumenänderungen fast vollständig über Kationen - bzw.

Anionenverschiebungen über die Mitochondrienmembran erklären. Die in der Literatur [102,103] zugrundegelegten Volumenänderungen nach Calcium in Gegenwart von Acetat rührten demnach nicht von osmotisch aktivem Calciumacetat her, sondern wurden alleine durch die Aufnahme von Acetat hervorgerufen. Wie bereits früher erwähnt, stützen vor allem die Untersuchungen von Heaton und Nicholls [60] die Vorstellung einer elektrophoretischen Calciumaufnahme über einen Uniporter, da theoretische und experimentell ermittelte Calciumverteilung nahezu übereinstimmen. Ihre Berechnungen basieren auf der Annahme eines Aktivitätskoeffizienten von 1 für Calcium in der Matrix. Neuere und unabhängige Untersuchungen ergaben jedoch eindeutig einen Aktivitätskoeffizienten von kleiner 0.001 [7,23]. Unter der Annahme eines Aktivitätskoeffizienten von 5×10^{-4} würden dann die Ergebnisse von Heaton und Nicholls [60] eindeutig für eine Calciumaufnahme nach dem Antiport-Mechanismus sprechen und die Aufnahme über einen Uniporter unnötig machen. An dieser Stelle kommt man nicht umhin, Zweifel an der Richtigkeit heutiger Vorstellungen von der mitochondrialen Calciumaufnahme und -abgabe anzumelden, da sowohl die Voraussetzungen für eine osmotisch aktive Calciumaufnahme über einen Uniport-Mechanismus (Verteilung nach dem Membranpotential und ein Aktivitätskoeffizient von 1) als auch die sich daraus ergebenden Konsequenzen für eine unabhängige Abgabe fehlerhaft sind.

6. L I T E R A T U R

[1] VASINGTON, F.D., MURPHY, J.V. (1962)
J. Biol. Chem. 237, 2670-2676

[2] LEHNINGER, A.L., CARAFOLI, E., ROSSI, C.S. (1967)
Adv. Enzymol. 29, 259-319

[3] NICHOLLS, D.G., CROMPTON, M. (1980)
FEBS Lett. 111, 261-268

[4] LEHNINGER, A.L. (1970)
Biochem. J. 119, 129-138

[5] BYGRAVE, F.L. (1977)
Curr. Top. Bioenerg. 6, 259-316

[6] CARAFOLI, E. (1979)
FEBS Lett. 104, 1-5

[7] DENTON, R.M., McCORMACK, J.G. (1980)
FEBS Lett. 119, 1-8

[8] CARAFOLI, E., CROMPTON, M. (1978)
Curr. Top. Membranes Transp. 10, 151-216

[9] MELA, L. (1977)
Curr. Top. Membranes Transp. 9, 321-366

[10] Saris, N.K., Åkerman, K.E.O. (1980)
Curr. Top. Bioenerg. 10, 103-179

[11] MITCHELL, P. (1968)
In: "Chemiosmotic Coupling and Energy Transduktion"
Glynn Research, Bodmin, UK

[12] MITCHELL, P. (1979)
Science 206, 1148-1159

[13] BRAGADIN, M., POZZAN, T., AZZONE, G.F. (1979)
Biochemistry 18, 5972-5978

[14] CROMPTON, M., SIGEL, E., SALZMANN, M., CARAFOLI, E.
(1976) Eur. J. Biochem. 69, 429-434

[15] HUTSON, S.M., PFEIFFER, D.R., LARDY, H.A. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 5251-5258

[16] MURPHY, E., COLL, K., RICH, T., WILLIAMSON, J.R.
(1980) J. Biol. Chem. 255, 6600-6608

[17] CROMPTON, M., HEDIGER, M., CARAFOLI, E. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 540-546

[18] RAMACHANDRAN, C., BYGRAVE, F.L. (1978)
Biochem. J. 174, 613-620

[19] PFEIFFER, D.R., KAUFFMAN, R.F., LARDY, H.A. (1978)
J. Biol. Chem. 253,4165-4171

[20] STUCKI, J.W., INEICHEN, E.A. (1974)
Eur. J. Biochem. 48, 365-375

[21] CROMPTON, M., CAPANO, M., CARAFOLI, E. (1976)
Eur. J. Biochem. 69, 453-462

[22] NICHOLLS, D.G. (1978)
Biochem. J. 176, 463-474

[23] WILLIAMSON, J.R., COOPER, R.H., HOEK, J.B. (1981)
Biochim. Biophys. Acta 639, 243-295

[24] FONYO, A., LIGETI, E. (1978)
FEBS Lett. 96, 343-345

[25] KOLBE, H.V.J., MENDE, P., KADENBACH, B. (1982)
Eur. J. Biochem. 128, 97-105

[26] KAPLAN, R.S., PEDERSEN, P.L. (1983)
Biochem. J. 212, 279-288

[27] ROSSI, C.S., LEHNINGER, A.L. (1964)
J. Biol. Chem. 239, 3971-3980

[28] MOYLE, J., MITCHELL, P. (1977)
FEBS Lett. 77, 136-140

[29] RUGOLO, M., SILIPRANDI, D., SILIPRANDI, N.,
TONINELLO, A. (1981)
Biochem. J. 200, 481-486

[30] ROOS, I., CROMPTON, M., CARAFOLI, E. (1980)
Eur. J. Biochem. 110, 319-325

[31] BERNARDI, P., PIETROBON, D. (1982)
FEBS Lett. 139,9-12

[32] BERNARDI, P., AZZONE, G.F. (1982)
FEBS Lett. 139,13-16

[33] ZOCCARATO, F., NICHOLLS, D.G. (1981)
FEBS Lett. 128, 275-277

[34] NICHOLLS, D., ÅKERMAN, K. (1982)
Biochim. Biophys. Acta 683, 57-88

[35] HAWORTH, R.A., HUNTER, D.R. (1979)
Arch. Biochem. Biophys. 195, 460-467

[36] BEATRICE, M.C., PALMER, J.W., PFEIFFER, D.R. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 8663-8671

[37] ZOCCARATO, F., RUGOLO, M., SILIPRANDI, D., SILIPRANDI, N. (1981)
Eur. J. Biochem. 114, 195-199

[38] PALMER, J.W., PFEIFFER, D.R. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 6742-6750

[39] LÖTSCHER, H.R., WINTERHALTER, K.H., CARAFOLI, E., RICHTER, C. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 9325-9330

[40] NICHOLLS, D.G., BRAND, M.D. (1980)
Biochem. J. 188, 113-118

[41] ROOS, I., CROMPTOM, M., CARAFOLI, E. (1978)
FEBS Lett. 94, 418-421

[42] LEHNINGER, A.L., VERCESI, A., BABABUNMI, E.A. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1690-1694

[43] WOLKOWICZ, P.E., McMILLIAN-WOOD, J. (1979)
FEBS Lett. 101, 63-66

[44] TSOKOS, J., CORNWELL, T.F., VLASUK, G. (1980)
FEBS Lett. 119, 297-300

[45] ROMAN, I., GMAJ, P., NOWICKA, C., ANGIELSKI, S. (1979)
Eur. J. Biochem. 102, 615-623

[46] BLACKMORE, P.F., DEHAYE, J.P., EXTON, J.H. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 6945-6950

[47] PUSKIN, J.S., GUNTER, T.E., GUNTER, K.K., RUSSELL, P.R. (1976) Biochemistry 15, 3839-3842

[48] MOORE, C.L. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 298-305

[49] VASINGTON, F.D., GAZZOTTI, P., TIOZZO, R., CARAFOLI, E. (1972) Biochim. Biophys. Acta 256,43-54

[50] CARAFOLI, E. (1982)
In: "Membrane Transport of Calicum" (Carafoli, E., ed.), 109-139, Academic Press, New York

[51] RAMACHANDRAN, C., BYGRAVE, F.L. (1981)
Cell Calcium 2, 411-423

[52] RIGONI, F., MATHIEN-SHIRE, Y., DEANA, R. (1980)
FEBS Lett. 120, 255-258

[53] POZZAN, R., BRAGADIN, M., AZZONE, G.F. (1977)
Biochemistry 16, 5618-5624

[54] FISKUM, G., COCKRELL, R.S. (1978)
FEBS Lett. 92, 125-128

[55] JUNG, D.W., BRIERLEY, G.P. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 432-438

[56] JURKOWITZ, M.S., GEISBUHLER, T., JUNG, D.W.,
BRIERLEY, G.P. (1983)
Arch. Biochem. Biophys. 223, 120-128

[57] HUNTER, D.R., HAWORTH, R.A. (1979)
Arch. Biochem. Biophys. 195, 453-459

[58] HUNTER, D.R., HAWORTH, R.A. (1979)
Arch. Biochem. Biophys. 195, 468-477

[59] ÅKERMAN, K.E.O. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 502, 359-366

[60] HEATON, G.M., NICHOLLS, D.G. (1976)
Biochem. J. 156, 635-646

[61] KAUFMANN, R.F., LARDY, H.A. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 4228-4235

[62] LÖTSCHER, H.R., WINTERHALTER, K.H., CARAFOLI, E.,
RICHTER, C. (1980), Eur. J. Biochem. 110, 211-216

[63] ROTTENBERG; H., SCARPA, A. (1974)
Biochemistry 13, 4811-4817

[64] AZZONE, G.F., BRAGADIN, M., POZZAN, T.,
DELL'ANTONE, P. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 459, 96-109

[65] COLL, K.E., JOSEPH, S.K., CORKEY, B.E., WILLIAMSON, J.R.
(1982) J. Biol. Chem. 257, 8696-8704

[66] BECKER, G.L., FISKUM, G., LEHNINGER, A.L. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 9009-9012

[67] BECKER, G.L. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 591, 234-239

[68] FLETSCHER, J.M., GREENFIELD, B.F., HARDY, C.J.,
SCARGILL, D., WOODHEAD, J.L. (1961)
J. Chem. Society, 2000-2006

[69] ESTABROOK, R.W. (1967)
In: "Methods in Enzymology (Estabrook, R.W., Pullman,
M.E., eds.) Vol. X , Academic Press, New York, p.41

[70] CHANCE, B., BALTSCHEFFSKY, M. (1958)
Biochem. J. 68, 283-295

[71] SZARKOWSKA, L., KLINGENBERG, M. (1963)
Biochem. Z. 338, 674-697

[72] WERKHEISER, W.C., BARTLEY, W. (1957)
Biochem. J. 66, 79-91

[73] PFAFF, E. (1965): Dissertation Marburg

[74] KRELL, H. (1975): Biochemische Diplomarbeit,
Tübingen

[75] CLARET, M., MAZET, J.L. (1972)
J. Physiol. 223, 279-295

[76] KRELL, H., TÄFLER, M., BLAICH, G., PFAFF, E. (1984)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 59-71

[77] CHANCE, B. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 2729-2748

[78] LEHNINGER, A.L. (1970)
Biochem. J. 119, 129-138

[79] MASSARI, S., FRIGERI, L., AZZONE, G.F. (1972)
J. Membrane Biol. 9, 57-70

[80] BLAICH, G., KRELL, H., TÄFLER, M., PFAFF, E. (1984)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 73-82

[81] ROTTENBERG, H. (1973)
J. Membrane Biol. 11, 117-121

[82] ROSSI, C., AZZI, A., AZZONE, G.F. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 951-957

[83] DAWSON, A.P., FULTON, D.V. (1980)
Biochem. J. 188, 749-775

[84] ZOCCARATO, F., NICHOLLS, D. (1982)
Eur. J. Biochem. 127, 333-338

[85] SILIPRANDI, D., SILIPRANDI, N., TONINELLO, A. (1983)
Eur. J. Biochem. 130, 173-175

[86] LIGETI, E., HORVÁTH, L. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 600, 150-156

[87] FISKUM, G., LEHNINGER, A.L. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 6236-6239

[88] LÖTSCHER, H.R., WINTERHALTER, K.H., CARAFOLI, E.,
RICHTER, C. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4340-4344

[89] WEHRLE, J.P., PEDERSEN, P.L. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 7269-7275

[90] LÖTSCHER, H.R., SCHWERZMANN, K., CARAFOLI, E. (1979)
FEBS Lett. 99, 194-198

[91] CROMPTON, M., CAPANO, M., CARAFOLI, E. (1976)
Biochem. J. 154, 735-742

[92] KUN, E. (1976)
Biochemistry 15, 2328-2336

[93] HÖSER, N., DARGEL, R., DAWCZYNSKI, H., WINNEFELD, K. (1976) FEBS Lett. 72, 193-196

[94] HUNTER, D.R., HAWORTH, R.A., SOUTHARD, J.H. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 5069-5077

[95] PFEIFFER, D.R., SCHMID, P.C., BEATRICE, M.C., SCHMID, H.H.O. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 11485-11494

[96] PARCE, J.W., CUNNINGHAM, C.C., WAITE, M. (1978)
Biochemistry 17, 1634-1640

[97] LUTHRA, R., OLSEN, M.S. (1977)
FEBS Lett. 81, 142-146

[98] JURKOWITZ, M.S., BRIERLEY, G.P. (1982)
J. Bioenerg. Biomembr. 14, 435-449

[99] BARDSLEY, M.E., BRAND, M.D. (1982)
Biochem. J. 202, 197-201

[100] RASMUSSEN, H., CHANCE, B., OGATA, E. (1965)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 1069-1076

[101] MITCHELL, P. (1966)
In: "Chemiosmotic Coupling in Oxidation and Photosynthetic Phosphorylation", Glynn Research, Bodmin, UK

[102] SELWYN, H.J., DAWSON, A.P., DUNNETT, S.J. (1970)
FEBS Lett. 10, 1-5

[103] SCARPA, A., AZZONE, G.F. (1970)
Eur. J. Biochem. 12, 328-335

[104] GUNTER, T.E., PUSKIN, J.S. (1976)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 364, 112-123

[105] CROMPTON, M., HEID, I. (1978)
Eur. J. Biochem. 91, 599-608

Lebenslauf

Am 26. Juli 1954 wurde ich in Oberkollwangen, Kreis Calw als Sohn des Rektors Gotthilf Blaich und seiner Ehefrau Maria, geb. Dürr, geboren.

Von 1961 - 1965 besuchte ich die Volksschule in Oberkollwangen, danach das Hermann-Hesse-Gymnasium in Calw, welches ich im Juni 1973 mit der allgemeinen Hochschulreife verließ.

Nach einer zweijährigen Bundeswehrzeit von Juli 1973 bis Juni 1975 in Donauwörth und Bruchsal begann ich im Wintersemester 1975/76 mit dem Studium der Biochemie an der Universität Tübingen, bis März 1978 legte ich den zweiten Teil des Vordiploms ab. Nach den mündlichen Diplomhauptprüfungen im Juli 1980 arbeitete ich von September 1980 bis August 1981 an meiner Diplomarbeit: "In-vitro-Proteinbindung von Paracetamol-Metaboliten in der Mäuseleber" unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Wendel am Institut für Physiologische Chemie der Universität Tübingen.

Die vorliegende Dissertation: "Einfluß von Phosphat und Ruthenium Rot auf das Calcium bei Rattenlebermitochondrien" wurde von Oktober 1981 bis Dezember 1983 unter Anleitung von Prof. Dr. E. Pfaff am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen angefertigt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	:	G. Weitzel, D. Mecke, A. Wendel
Organische Chemie	:	E. Bayer, M. Hanack
Anorganische Chemie	:	E. Lindner, J. Strähle
Physikalische Chemie	:	H. Mauser, W. Zeil
Anatomie	:	K. Reutter, M. Arnold
Physik	:	F. Gönnenwein
Botanik	:	H. Metzner
Zoologie	:	K.G. Grell
Mathematik	:	H. Pommer
Mikrobiologie	:	V. Braun, H. Zähner
Pharmakologie	:	M. Siess, U. Breyer-Pfaff
Toxikologie	:	H. Remmer, E. Pfaff
Physiologie	:	E. Betz
Histologie	:	K. Reutter

difo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/6 43 21